

**DIE BEHEER VAN HARTSPIERKONTRAKTILITEIT DEUR DIE
BEWEGING VAN KALSIUMIONE DEUR DIE SARKOLEMMA**

CHRISTIAAN MARTIN LUDWIG STEINMANN

**Verhandeling ingedien ter gedeeltelike nakoming van die vereiste vir die graad
Magister Scientiae (Fisiologie) aan die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike
Hoër Onderwys**

POTCHEFSTROOM

JANUARIE 1978

INHOUDSOPGAWE

HOOFSTUK I

1	Doel en motivering	1
	Hipotese I	1
	Hipotese II	2

HOOFSTUK II

2	Literatuuragtergrond	4
2.1	Kontraktiliteit	4
2.1.1	Skeletspier	5
2.1.2	Hartspier	7
2.1.2.1	Lengte-spanningsdiagramme	7
2.1.2.2	Die invloed van die ekstrasellulêre kalsiumkon- sentrasie op kontraktiliteit	8
2.2	Eksitasie-kontraksiekoppeling	10
2.2.1	Aktivering van die sarkoplasmiese retikulum en die mitochondria	10
2.2.2	Aktivering van die sarkolemma	14
2.3	Kalsiumuitvloei	15
2.3.1	Farmaka en chemiese stowwe	21
2.4	Kalsiuminvloei (Kalsiumopname)	23
2.5	Die invloed van die intrasellulêre natriumkon- sentrasie op kalsiumvloei	25
2.6	Die fisiologiese rol van kalsiuminvloei en kal- siumuitvloei	26

HOOFSTUK III

3	Metode	28
3.1	Spierpreparaat	28
3.2	Kalsiuminvloei (kalsiumopname)	29
3.3	Totale kalsium	30
3.4	Kalsiumuitvloei	31
3.5	Kontraktuur	32
3.5.1	Perfusie-apparaat	32
3.6	Reagense	34
3.7	Statistiek	34

HOOFSTUK IV

4	Resultate en bespreking	35
4.1	Inleiding	35
4.2	Die verband tussen die ekstrasellulêre kalium= konsentrasie (membraanpotensiaal) en kontrak= tuur (kontraktiliteit)	37
4.3	Die verband tussen die ekstrasellulêre natrium= konsentrasie en kontraktuur	43

HOOFSTUK V

Algemene bespreking	60
----------------------------	----

HOOFSTUK VI

Opsomming	64
Summary	66
Literatuur	68
Bedankings	80

HOOFSTUK I

1. DOEL EN MOTIVERING

Twee eienskappe van die kontraktiliteit van hartspier wat van fundamentele belang is vir eksitasie-kontraksiekoppeling en vir die inotrope meganisme by hartspier is ondersoek aan die hand van twee hipoteses:

Hipotese I: Die uitvloei van Ca^{2+} deur die sarkolemma is verantwoordelik vir eienskappe aangaande die verband tussen die kontraksiekrag en die membraanpotensiaal.

In die literatuur word twee tipiese voorstellings gevind vir die verband tussen die membraanpotensiaal en kontraksiekrag. Indien 'n selmembraan gedepolariseer word met 'n spanningsklemming of met 'n verhoging in die ekstrasellulêre K^+ -konsentrasie, ontwikkel kontraksiekrag soos voorgestel in figuur 1, bladsy 37.

Eksperimentele resultate wat plaaslik verkry is (Allers, 1972; van der Walt en Allers, 1973; Van Wyk, 1973) met marmot- en skaaphartspiertjies onderskryf die hipotese dat die kontraksiekrag afneem nadat dit 'n maksimum by ongeveer 40 mM K^+ bereik het, anders as resultate wat aantoon dat die kontraksiekrag konstant bly nadat dit 'n maksimum bereik het. (Anderson & Edman, 1974; Gibbons & Fozzard, 1971; Hodgkin & Horowitz, 1960).

Om die meganisme van hierdie afname vas te stel is ^{45}Ca -uitvloei en ^{45}Ca -opname van hartspier bepaal wat tot verskillen-

de membraanpotensiale gedepolariseer is deur 'n verhoging van die K^+ in die perfusiemedium.

Hipotese II: Die toename in meganiese spanningsontwikkeling wat verkry word met 'n verhoging in die ekstrasellulêre Na^+ -konsentrasie van 0 na 20 mM (protagonisme, figuur 5) kan toegeskryf word aan 'n toename in Ca^{2+} -opname (Busselen en Carmeliet, 1973; Busselen en van Kerkhove, 1975).

Protagonisme (Allers, 1972; Busselen et al., 1973 en 1975) is 'n teenstrydigheid ten opsigte van die welbekende Na^+ - Ca^{2+} -antagonisme (Lüttgau en Niedgergerke, 1958), wat aantoon dat 'n verlaging in die ekstrasellulêre Na^+ -konsentrasie 'n toename in spanningsontwikkeling tot gevolg het (figuur 5). Die toename in spanningsontwikkeling is afhanklik van die $\{Ca^{2+}\}_0 : \{Na^+\}_0^2$ verhouding.

Hierdie hipotese word aan die hand van eksperimentele resultate geëvalueer, met die klem op die eksperimentele milieu. Alhoewel die ioonsamestellings nie verteenwoordigend is van 'n normale fisiologiese milieu nie, word by die interpretasie van die resultate gepoog om te bepaal of die sellulêre strukture onbeskadig en funksioneel is. Die eksperimentele resultate van die projek lewer inligting in verband met die transport van Ca^{2+} by die selmembraan en dus indirek informasie aangaande die meganismes van kontraksie soos by hartspier onder normale fisiologiese omstandighede aangetref word.

In hoofstuk IV word sekere waarnemings wat met kontraktuureksperimente verkry is, aangetoon. Die waarnemings word vergelyk met waarnemings in die literatuur. Met behulp van kalsiumvloei-eksperimente is na verklarings, vir sekere waarnemings met die

kontraktuureksperimente, gesoek. Daar is ook verklarings vir die verskille tussen eie resultate en resultate in die literatuur gesoek. Die eksperimentele metode word in hoofstuk III beskryf. Hoofstuk II is 'n literatuuragtergrond wat die vloei van kalsiumione oor die selmembraan en die rol wat dit in eksitasie-kontraksiekoppeling speel, beklemtoon. Die beheer van kontraktiliteit deur die beweging van kalsiumione is dus ook ter sprake. In hoofstuk V word beskadiging en spesieverskille as die moontlike onderliggende redes vir sekere resultate bespreek.

Die terme kalsiumopname of kalsiuminvloei dui beide die beweging van Ca^{2+} deur die selmembraan, in die sel in aan.

$\{ \}_o$ — *ekstrasellulêre konsentrasie*

$\{ \}_i$ — *intraseellulêre konsentrasie*

HOOFSTUK II

2. LITERATUURAGTERGROND

2.1 Kontraktiliteit

Om die funksionele betekenis van sekere strukture in hartspier, asook die invloed van die eksterne milieu op die fisiologiese funksie van die hart na te gaan, is dit noodsaaklik om 'n duidelike omskrywing van hartspierkontraktiliteit te verkry.

Die teorieë van kontraktiliteit is in 'n groot mate gebaseer op gegewens wat ingesamel is met eksperimente op skeletspier van 'n verskeidenheid van Vertebrata.

Skeletspier vertoon sekere eienskappe wat dit baie geskikte studiemateriaal maak vir die meting van kontraktiliteit:

- (a) die hoë graad van strukturele organisasie maak dit maklik om strukturele veranderinge waar te neem tydens kontraktiliteitse aktiwiteit,
- (b) die grootste gedeelte van die selmassa bestaan uit kontraktiliese proteïene sodat genoegsame hoeveelhede beskikbaar is vir biochemiese analise,
- (c) die funksie van die spiersel in die vorm van verkorting en spanningsontwikkeling is relatief maklik meetbaar, veral aangesien skeletspier homogeen van vorm is.

Dié eienskappe geld ook vir die papilêr- en trabekulêrspier in die hart van sommige soogdiere.

2.1.1 Skeletspier

Die vermoë van 'n skeletspier om arbeid te verrig, hang van die volgende faktore af:

- (a) Die mate van uitgerektheid van die spier, dit wil sê die lengte van die sarkomere (Huxley, 1965). 'n Ontspanne spier is elasties en bied min weerstand teen rekking. Die totale spanning wat 'n spier uitoefen, is die som van die passiewe spanning (as gevolg van die elastisiteit) en die aktiewe spanning (as gevolg van aktien- en miosieninteraksies). Die sarkomeerlengte waar die krag die grootste is, staan bekend as L_{maks} . By L_{maks} is die sarkomere 2,2 mikron lank. Dit is die lengte waarby die twee stelle van miofilamente van die sarkomeer so oorvleuel dat die area vir interaksie tussen die dik- en die dun filamente die grootste is. Die spanning in die spier neem af aan weerskante van die optimale waarde L_{maks} (Gordon, Huxley & Julian, 1966; Podolsky, 1964). Ter ondersteuning van die skuiffilamenthipotese is gevind dat spanningsontwikkeling direk verband hou met die afname in oorvleueling tussen die dik en die dun filamente en dus ook met 'n afname in die aantal aktien-miosienbindings. Hoe meer aktien-miosienbindings bestaan, hoe groter is die spanningsontwikkeling (Gordon et al., 1966).
- (b) Daar bestaan 'n direkte verband tussen die snelheid van verkorting en die belasting van die spier. Met verhoogde belasting neem die hoeveelheid verkorting en die snelheid van verkorting af. Hoe groter die belasting is, hoe langer

duur dit om die serie-elastiese element te rek. As die belasting die nulwaarde nader, neem die snelheid van verkorting toe en die maksimum verkortingsnelheid, V_{maks} , word teoreties bereik (Brobeck, 1973; Davson, 1970).

- (c) Die grootte van die kontraksiekrag van 'n spier word ook bepaal deur die grootte en duur van die aktiewe toestand asook van die graad van tetanisering. Omdat spierproteïene in 'n vloeistofmedium beweeg, is viskositeit ook 'n faktor wat die grootte van die kontraksiekrag beïnvloed. Energie gaan as wrywingshitte verlore met die beweging van die spierproteïene. Hoe vinniger die beweging plaasvind, hoe groter is die invloed van viskositeit. Aangesien die aktiewe toestand (wat die spanningsontwikkeling direk oor die spierproteïene is) vir 'n baie kort tyd duur tydens aktivering van die spier, speel viskositeit 'n groot rol en is die spanning op die uiteinde van die spier baie kleiner as die grootte van die aktiewe toestand. Verlenging en vergroting van die aktiewe toestand het dus 'n verhoging in kontraksiekrag tot gevolg (Huxley, 1965; Davson, 1970).
- (d) Die vermoë om arbeid te verrig, hang ook af van die hoeveelheid energie wat vrygestel word, dit wil sê van die hoeveelheid en tempo van ATP-hidrolise. Die hidrolise van ATP hang saam met die beskikbaarheid van kalsiumione wat aan troponien bind. ATP het egter 'n tweeledige funksie in die sin dat dit kontraksie sowel as verslapping kan induseer. Die funksie word deur verskillende faktore soos ioniese sterkte, ATP, pH en temperatuur bepaal (Ebashi & Endo, 1968).

2.1.2 Hartspier

By hartsier geld bogenoemde faktore met 'n paar wysigings:

2.1.2.1 Lengte-spanningsdiagramme

Die aktiewe toestand in hartsier duur baie langer as in skeletspier. In die papilêrspier is die grootte van die aktiewe toestand ongeveer 60 millisekondes na stimulasie maksimaal, en aktiwiteit begin afneem na ongeveer 100 millisekondes. In skeletspier is die rustende spanning baie klein by L_{maks} en styg heelwat tydens die afgaande fase van die lengte-aktiewe-spanningskurwe (Braunwald et al., 1967, 1968; Sonnenblick, 1967). Die relatiewe hoë rustende spanning in hartsier kan moontlik toegeskryf word aan 'n groot hoeveelheid bindweefsel tussen die spiervesels.

Vergroting van die hartkamers, groter as die normale fisiologiese waardes, kom voor tydens chroniese en akute abnormale toestande. Onder hierdie toestande vind verlenging van hartsier plaas sonder dat daar 'n toename in sarkomeerlengte is - stratifikasie en longitudinale gly van vesels vind plaas. Met veselglyding gly indiwiduele vesels longitudinaal verby mekaar, in verskillende rigtings. 'n Verandering in stratifikasie het 'n relatiewe verskuiwing van vesels ten opsigte van mekaar regoekig met die lengte-as van die miokardiale vesels tot gevolg. Daar is dus 'n herrangskikking van vesels van aangrensende lae van die miokardium. Op die wyse word die wanddikte verminder en die oppervlakte vergroot (Brobeck, 1973; Leyton & Sonnenblick, 1969).

Die afname in aktiewe spanning by lengtes groter as L_{maks} kan in die hart ook nie primêr toegeskryf word aan 'n afname in oorvleueling van aktien en miosien nie, maar hou eerder verband met 'n verandering in eksitasie-kontraksiekoppeling.

Die parallel-elastiese element (PEE) is heelwat groter in hartspier en dit het 'n direkte invloed op kontraktiliteit. Die rede vir die vinnige afname in aktiewe spanning as L_{maks} bereik is, kan ook moontlik toegeskryf word aan die stywe PEE van hartspier. As die PEE parallel ten opsigte van die kontraktiele element (KE) gerangskik is, maar nie parallel ten opsigte van die serie-elastiese element (SEE) nie, soos in die model van Voigt, sal verkorting van die KE ook aanleiding gee tot verkorting van die PEE. Die verkorting sal 'n gedeelte van die spanning wat deur die PEE gedra word ophef en 'n deel van sy las sal deur die KE oorgeneem word. Daar moet egter in ag geneem word dat by lengtes groter as L_{maks} kan daar veranderinge in die elektriese eienskappe van die vesel plaasvind wat die proses van eksitasie-kontraksiekoppeling benadeel (Brobeck, 1973; Braunwald et al., 1967, 1968; Davson 1970).

2.1.2.2 Die invloed van die ekstrasellulêre kalsiumkonsentrasie op kontraktiliteit

'n Verdere belangrike verskil tussen hartspier en skeletspier is die afhanklikheid van die kontraktiliteit by hartspier van die ekstrasellulêre Ca^{2+} -konsentrasie. Ringer het reeds in 1883 aangetoon dat ioniese kalsium in die perfusiemedium onontbeerlik is vir die onderhouding van die hartslag (volgens Olson, 1971). By skeletspier neem die kontraktiele aktiwiteit af in ooreenstemming met die stadige afname in die intrasellulêre $\{Ca^{2+}\}$. Laasgenoemde word aan effektiewe intrasellulêre Ca^{2+} -store toegeskryf.

Die spanningsontwikkeling by hartspier word in 'n groot mate beheer deur die Ca^{2+} -invloei tydens die aksiepotensiaal. Tydens depolarisasie neem die deurlaatbaarheid van die selmembraan vir Ca^{2+} toe (Reuter & Scholz, 1968). Die verhoogde sterkte van kontraksie as gevolg van 'n korter interval tussen twee same-trekkings (Bowditchfenomeen) is die gevolg van 'n verhoogde Ca^{2+} -opname (Bianchi & Shanes, 1959; Grossman & Furchgott, 1964b; Nayler, 1960). As 'n reeks van vinnige stimulasies gevolg word deur 'n pouse sal die eerste volgende slag gepotensieer wees (ruspotensiëring). Die vinnige stimulasies het 'n verhoging in die mioplasmiese Ca^{2+} -konsentrasie tot gevolg. Gedurende die daaropvolgende pouse bind die Ca^{2+} aan intrasellulêre store waarvandaan dit met die volgende depolarisasie vrygestel word. Verplasing van een intrasellulêre stoor na 'n ander tydens die rusperiode het in hierdie geval, potensiëring tot gevolg (Rosin & Farah, 1955).

Ook stimuli wat in pare toegedien word, het 'n verhoogde kontraktiliteit tot gevolg (Cranefield, 1965; Kavalier et al., 1965). Enige variasie in die intervallengte tussen stimuli het dus 'n verandering in die inotrope toestand van hartspier tot gevolg, as gevolg van 'n verandering in eksitasie-kontrakciekoppeling. Dit blyk dus dat Ca^{2+} -invloei noodsaaklik is vir spanningsontwikkeling. Daar moet egter in gedagte gehou word dat spanningsontwikkeling deur verhoogde Ca^{2+} -invloei voorafgegaan word. Dit vind nie gelyktydig plaas nie (Wood et al., 1969).

'n Vinnige toename in kontraktiliteit vind plaas as die ekstrasellulêre $\{\text{Na}^+\}$ verlaag word by hartpreparate. Dit word verklaar deur 'n hoër intrasellulêre Ca^{2+} -konsentrasie - daar is 'n afname in kompetisie van Na^+ vir die Ca^{2+} -bindingsplek en moontlik ook 'n toename in die uitruilingstempo van ekstrasellulêre

Ca^{2+} vir intrasellulêre Na^+ (Niedergerke, 1963(a); 1963(b); Reuter, 1974). 'n Verhoogde vrystelling van Ca^{2+} uit die sarkoplas= miese retikulum en mitochondria kan ook die rede wees vir die verhoogde spanningsontwikkeling. Alle faktore wat kontrakti= teit beïnvloed, is onderhewig aan verandering sodra spierpre= parate geïsoleer word uit die normale milieu van die lewende dier. Die hipodinamiese afname in kontraktiliteit met tyd na isolasie is 'n aanduiding van sodanige veranderinge waarmee rekening gehou moet word in alle eksperimentele opstellings.

2.2 Eksitasie-kontraksiekoppeling

'n Aksiepotensiaal in 'n spiersel ontstaan op enige punt op die sarkolemma waar die membraanpotensiaal met ongeveer 15 milli= volt verhoog bo die ruspotensiaal om die drempelwaarde te oor= skry. By skeletspier kan dit gebeur by die motoriese eind= plaat of teenoor 'n katode, as direkte stimulasie deur elek= trodes toegedien word. By die hartspier ontstaan die impuls by die sino-atriale knoop en word daarvandaan van sel tot sel gelei. Die aksiepotensiaal verloop in albei rigtings oor die membraan vanaf die stimulusposisie. As gevolg van elektromeg= niese koppeling gee die aksiepotensiaal aanleiding tot spier= kontraksie. Resente navorsing toon aan dat hartspiervesels wat met kolaginase behandel is ook die vermoë tot ritmiese kon= traksie besit, ten spyte van die feit dat daar geen elektriese potensiaal oor hierdie selmembrane is nie (Inesi, 1977).

2.2.1 Aktivering van die sarkoplasmiese retikulum en die mito= chondria

Vanaf die sarkolemma verloop die T-buis na die binnekant van die sel. Die binnekant van die T-buis is 'n voortsetting van die

ekstrasellulêre ruimte (Lindner, 1957; Simpson en Oertelis, 1961). 'n T-buis sluit deur middel van die sisternae by die sarkoplasmiese retikulum aan. Daar is 'n membraan tussen die T-buis en die sisternae sodat hulle lumens nie aaneenlopend is nie.

Die aksiepotensiaal op die sarkolemma kan dus met behulp van die T-buise vinnig na die binnekant van die sel gelei word. Die membraanpotensiaalverandering van die T-buise (Constantin, 1970) het waarskynlik 'n vinnige regeneratiewe vrystelling van Ca^{2+} uit die sisternae van die sarkoplasmiese retikulum tot gevolg. Daar bestaan 'n sterk vermoede dat die basis van hierdie vrystelling depolarisasie van die sarkoplasmiese retikulum is, dit wil sê: 'n potensiaalverandering oor die membraan van die sarkoplasmiese retikulum (Constantin & Podolsky, 1966). Akkumulasie van Ca^{2+} deur die sarkoplasmiese retikulum veroorsaak verslapping. Die sisternae is waarskynlik die presiese plek van Ca^{2+} -vrystelling (Winegrad, 1970).

Waterstofione het 'n invloed op kalsiumopname en kalsiumvrystelling onder *in vitro* toestande by die sarkoplasmiese retikulum. Indien aktomiosien en sarkoplasmiese retikulum saam in die preparaat teenwoordig is, vind superpresipitasie plaas indien die pH van 6,5 tot 7,3 verhoog word.

As die pH verminder word van 7,56 na 6,46 vind daar herbinding aan die sarkoplasmiese retikulum plaas (Nakamaru & Schwartz, 1972).

pH speel dus waarskynlik 'n rol in eksitasie-kontrak siekoppe ling, *in vitro*. As depolarisasie van die sarkoplasmiese retikulum gepaard gaan met pH veranderinge, speel pH waarskynlik 'n

belangrike rol in eksitasie-kontraksiekoppeling *in vivo*.

Die optimum pH vir kalsiumbinding is 6,1 tot 6,3. Bogenoemde gegewens het belangrike konsekwensies as verder ook in ag geneem word dat ATP produksie deur middel van anërobie se weë 'n akkumulering van waterstofione in die sel tot gevolg het (as gevolg van melksuurproduksie). 'n Verlaging in pH het dan ook 'n afname in die ATP-ase-aktiwiteit van die miofibrille tot gevolg, in die afwesigheid en teenwoordigheid van Ca^{2+} (Williams et al., 1975).

'n Moontlike afname in kontraktiliteit met 'n verlaging in pH kan dus aangetoon word. Behalwe dat dit toegeskryf kan word aan gebeure by die sarkoplasmiese retikulum kan 'n afname in kontraktiliteit moontlik ook toegeskryf word aan 'n H^+ kompetisie met Ca^{2+} by die selmembraan en by die troponienmolekule.

Kalsiumopname en kalsiumvrystelling vind *in vitro* plaas by sowel mikrosome as mitochondria. Dit word algemeen aanvaar dat die opname en vrystelling deur die sarkoplasmiese retikulum gegaan word met verslapping en sametrekking (Weber et al., 1963 en 1966).

Faktore wat aanleiding gegee het tot die studie van kalsiumopname en kalsiumvrystelling deur die mitochondria van hartspier is:

- a. die sarkoplasmiese retikulum wat by skeletspier 'n belangrike rol speel in kalsiumopname en kalsiumvrystelling, is minder in hartspier en is struktureel ook swakker ontwikkel. (Carafoli, 1974),
- b. die sarkoplasmiese retikulum in hartspier het 'n baie klein

ner vermoë om Ca^{2+} te transporteer as wat vinnige skeletspier se sarkoplasmiese retikulum het (Fanburg et al., 1964).

c. hartspier bevat meer mitochondria as skeletspier.

Kalsiumakkumulasie deur geïsoleerde mitochondria kan in afwesigheid van energie geskied deur passiewe binding of deur 'n aktiewe opname wat hidrolise van ATP benodig. Daar is genoegsame bewys dat mitochondria Ca^{2+} kan akkumuleer: dit is byvoorbeeld aangetoon dat intraperitoneaal ingespuite Ca^{2+} eerder in die mitochondria as in die sarkoplasmiese retikulum van hartspier konsentreer (Patriarca & Carafoli, 1968). Daar is ook aangetoon dat mitochondria Ca^{2+} passief bind tydens verslapping van spiervesels en dat mitochondria die verslappingproses kan induseer (Carafoli, 1974; Carafoli et al., 1974).

Min gegewens bestaan oor die vrystelling van Ca^{2+} deur die mitochondria. Daar is egter gevind dat die vrystelling wel kan plaasvind. Respiratoriese inhibitere, ontkoppelingsagente en anoksie kan die vrystelling induseer. Byvoeging van natriumchloried induseer ook vrystelling met die gevolg dat die vrystellingsproses ook afhanklik kan wees van Na^+ (Carafoli et al., 1974).

Die moontlikheid bestaan dus dat die mitochondria 'n belangrike bydrae kan lewer tot die hoeveelheid Ca^{2+} wat beskikbaar is vir eksitasie. Om 'n prominente rol in eksitasie-kontraksiekoppeling te speel sal die mitochondria egter in staat moet wees om genoeg Ca^{2+} vry te stel om kontraksie aan die gang te sit en/of genoeg kalsium op te neem om verslapping te bewerkstellig. Die vrystelling en opname moet ook binne 'n sekere tyd geskied.

Die rol van die sarkoplasmiese retikulum as primêre akkumuleerder en vrysteller van Ca^{2+} is egter nog die heersende tendens in die literatuur.

2.2.2 Aktivering van die sarkolemma

Die membraanpotensiaalverandering oor die sarkolemma gaan gepaard met die invloei van Ca^{2+} vanaf die ekstrasellulêre ruimte. Ca^{2+} vanaf die ekstrasellulêre vloeistof is nie primêr betrokke by kontraksie van skeletspier nie, maar wel by hartspier. Die invloei van Ca^{2+} is aangetoon met 'n kalsiumsensitiewe kleurstof, murexide, in die selle van 'n paddaspier. Veranderinge in ligabsorpsie het 'n styging in intrasellulêre Ca^{2+} aangetoon as die spier gestimuleer word (Jöbsis & O'Connor, 1966).

Die vraag ontstaan of die invloei van Ca^{2+} deur die sarkolemma tydens die platofase van die aksiepotensiaal direk betrokke is by kontraksie.

Die verhoging in die intrasellulêre Ca^{2+} -konsentrasie deur middel van Ca^{2+} -invloei is waarskynlik nie groot genoeg om die ATP-ase ensiem te aktiveer nie en is dus waarskynlik ook nie direk vir kontraksie verantwoordelik nie. Dit is aangetoon dat die hoeveelheid Ca^{2+} wat betrokke is by kontraksie meer is as die hoeveelheid Ca^{2+} in die ekstrasellulêre fase (Niedergerke, 1957). Die Ca^{2+} vanaf die ekstrasellulêre vloeistof kan moontlik dien as 'n *stimulus* vir die vrystelling van Ca^{2+} uit die sarkoplasmiese retikulumbuissisteem. As die intrasellulêre $\{\text{Ca}^{2+}\}$ 'n waarde van tussen 10^{-5} en 10^{-7} M bereik het, het dit die aktivering van die kontraktiele proteïene tot gevolg (Weber et al., 1964). 'n Volgehoue toename in die intrasellulêre Ca^{2+} het 'n positiewe inotrope effek tot gevolg (Nayler & Merrillees, 1971).

'n Verhoging van die intrasellulêre Ca^{2+} lei tot die binding van Ca^{2+} aan die troponienmolekule. Dit hef moontlik die inhiberende invloed van die troponien-tropomiosienkompleks op kontrakisie op. Daar vind klaarblyklik 'n beweging van die tropomiosienmolekule op die aktienband plaas, met die gevolg dat bindingsplekke daarop oopgaan en die miosien-ATP-kompleks daaraan bind. Die energievrystelling, afkomstig van die hidrolise van ATP, veroorsaak dan die beweging van die dwarsbruggies (Katz, 1970).

Onder normale omstandighede word Ca^{2+} vanaf die kontraktiele proteïne deur 'n *kalsiumpomp* in die sarkoplasmiese retikulum-membraan verwyder. Die Ca^{2+} bind aan, en word aktief opgeneem deur die sarkoplasmiese retikulum, waar dit gestoor word. Die aktiwiteit van die kalsiumpomp is afhanklik van die repolarisasie van die sarkolemma, dit wil sê ook van die repolarisasie van die T-buise en die sarkoplasmiese retikulum (Ebashi & Endo, 1968; Hayler & Merrillees, 1971).

2.3 Kalsiumuitvloei

Kalsiumuitvloei vind deur die sarkolemma plaas (Reuter & Seitz, 1968). Die uitvloei verhoed oorbelading van die sel en dus ook van intrasellulêre strukture soos die sarkoplasmiese retikulum en die mitochondria. Dit verhoed dus ook ont koppeling van oksidatiewe fosforilasie, verlies van ATP, en uiteindelijke seldood (Fleckenstein et al., 1974). Daar bestaan twee moontlike meganismes vir Ca^{2+} -uitvloei:

- (a) 'n direkte kalsiumpomp wat energie van ATP gebruik.
- (b) 'n uitwaartse beweging van Ca^{2+} wat in 'n groot mate van

die Na^+ -gradient afhanklik is en dus indirek ook van die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -pomp (Reuter & Seitz, 1968).

Die uitvloei dra daartoe by dat die intrasellulêre Ca^{2+} onder 'n sekere waarde bly, met die gevolg dat aktivering van die kontraktiele proteïene nie plaasvind nie. Die affiniteit van Ca^{2+} vir die uitvloeisisteem, (draersisteem) is dus moontlik hoër tydens die rustende toestand van hartsier as wat die affiniteit van troponien vir Ca^{2+} is. Dit verklaar waarom die sier kan verslap met 'n toename van die intrasellulêre Na^+ -konsentrasie in die teenwoordigheid van kafeïen en sianied (wat 'n verhoogde vrystelling van Ca^{2+} uit intrasellulêre store tot gevolg het) (Jundt et al., 1975). Die tempo waarteen die uitvloeisisteem funksioneer is egter te stadig om alleen vir verslapping van hartsier verantwoordelik te wees.

Die uitvloei van ^{45}Ca , nadat 'n sier vir 'n tyd lank met hierdie isotoop gelaai is, is 'n eksponensiële funksie van die tyd. Meer as een eksponensiële word in die uitvloeikurve waargeneem.

Die uitvloei tydens die eerste uur word toegeskryf as hoofsaaklik vanuit die ekstrasellulêre ruimte en vanaf ekstrasellulêre bindingsplekke. Dit vertoon dan ook drie eksponensiële komponente (Reuter & Seitz, 1968; Winegrad & Shanes, 1962). Meer eksponensiële word ook in die literatuur aangetoon (Shine & Langer, 1971; Langer, 1964).

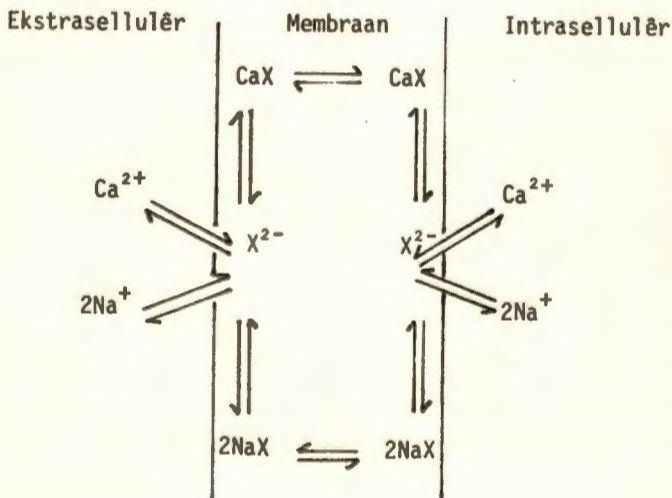
Na die eerste uur vind die uitvloei van ^{45}Ca waarskynlik vanaf verskillende intrasellulêre stoorplekke plaas. Die verskillende eksponensiële verteenwoordig moontlik verskillende store. Die tempokonstante van elke eksponensiële kan 'n aanduiding wees van watter betrokke stoor deur 'n betrokke eksponensiële verteen-

woordig word (Langer, 1964).

Die uitvloei van Ca^{2+} geskied deur 'n meganisme waartydens intrasellulêre Ca^{2+} vir ekstrasellulêre Na^+ en Ca^{2+} uitgeruil word. 'n Daling in die ekstrasellulêre $\{\text{Na}^+\}$ of $\{\text{Ca}^{2+}\}$ het 'n afname in uitvloei tot gevolg: ^{45}Ca -uitvloei verminder tot 'n waarde van 70% in 'n 0 mM Ca^{2+} -oplossing; tot 20% in 'n 0 mM Ca^{2+} -0 mM Na^+ -oplossing en tot 65% in 'n 0 mM Na^+ -oplossing. 'n Na^+ -geaktiveerde fraksie van Ca^{2+} -uitvloei en 'n Ca^{2+} -geaktiveerde fraksie word aangetref (Reuter & Seitz, 1968).

Die Na^+ en Ca^{2+} wat in die uitruilingsproses betrokke is, kompeteer vir 'n draer in die verhouding $2\text{Na}^+:1\text{Ca}^{2+}$ (Lüttgau & Nierdergerke, 1958; Reuter & Seitz, 1968). Die draer besit waarskynlik 2 negatiewe ladings: daarom bind 2Na^+ of 1Ca^{2+} daaraan.

Skemasies kan die draersisteem soos volg voorgestel word:



Die draer word voorgestel deur X^{2+} en beweeg as CaX of $2NaX$ oor die membraan. Die ongebonde draer beweeg stadiger oor die membraan (Glitsch et al., 1970; Reuter, 1974). As Na^+ of Ca^{2+} ekstrasellulêr verminder word, neem die waarskynlikheid toe dat die draer sonder binding aan Ca^{2+} of Na^+ na binne sal beweeg. Die draer beweeg dan stadig en gevolglik neem kalsiumuitvloei af.

Die draersisteem is ook soos volg voorgestel:

$2Na + CaR \rightleftharpoons Na_2R + Ca$ (Lüttgau & Niedergerke, 1958). R is die bindingsplek waarmee Ca^{2+} kan bind om 'n aktiewe CaR kompleks te vorm in die sin dat dit spanningsontwikkeling kan aktiveer, of Na_2R kan gevorm word wat nie spanningsontwikkeling aktiveer nie.

Wanneer die wet van massawerking op die vergelyking:

$2Na + CaR \rightleftharpoons Na_2R + Ca$ toegepas word, word die volgende vergelyking verkry:
$$\frac{\{Ca^{2+}\}}{K \{Na^+\}^2} = \frac{\{CaR\}}{1 - \{CaR\}}$$

waar k die ekwilibriumkonstante is ('n aanduiding van die affiniteit van Na^+ vir R in verhouding tot die affiniteit van Ca^{2+}). Die affiniteit van Na^+ neem dus af as die affiniteit van Ca^{2+} toeneem (Lüttgau & Niedergerke, 1958).

Die volgende uitruilingsmoontlikhede bestaan by die membraan:

- | | |
|---------------------|-------------------|
| (a) $Na_0 - Ca_i$, | (b) $Ca_0 - Ca_i$ |
| (c) $Ca_0 - Na_i$, | (d) $Na_0 - Na_i$ |

$Na_0 - Ca_i$ uitruiling is waarskynlik die doeltreffendste van die vier moontlikhede. $Ca_0 - Ca_i$ uitruiling sal nie so doeltreffend wees nie, want vir elke een Ca^{2+} wat inbeweeg, sal een Ca^{2+} uitbeweeg.

Die bekende Na^+ - Ca^{2+} -antagonisme ten opsigte van hartspier=kontraksie, naamlik dat 'n afname in die ekstrasellulêre Na^+ of 'n toename in die ekstrasellulêre Ca^{2+} 'n positiewe inotrope werking het (Lüttgau & Niedergerke, 1958) kan moontlik deur bo=genoemde meganisme verklaar word. In beide gevalle neem Na_0 - Ca_i -uitruiling af en Ca_0 - Ca_i -uitruiling toe. Dit het tot gevolg dat die intrasellulêre Ca^{2+} styg en die kontraktiliteit toeneem.

Daar kan onderskei word tussen 'n Na^+ -geaktiveerde en 'n Ca^{2+} -geaktiveerde komponent van Ca^{2+} -uitvloei. Hulle respektiewelike bydraes word bepaal deur die verhouding $\{\text{Ca}^{2+}\}_0 / \{\text{Na}^+\}_0^2$ soos weerspieël uit die wet van massa-aksie en eksperimentele gege=wens. Dit wil sê dat as die ekstrasellulêre (Ca^{2+}) afneem sal die Na^+ -geaktiveerde Ca^{2+} -uitvloei toeneem en as die ekstrasel=lulêre (Na^+) afneem, sal die Ca^{2+} -geaktiveerde Ca^{2+} -uitvloei toe=neem. Volgens die literatuur is 80% van die uitvloei afhanklik van die Na^+ -geaktiveerde Ca^{2+} -uitvloei, dit wil sê van Na_0 - Ca_i uitruiling (Reuter, 1974).

Wat die tempo van Ca^{2+} -uitvloei betref, is dit direk eweredig aan $\{\text{Na}^+\}_0 + \{\text{Ca}^{2+}\}_0$ (Glitsch et al., 1970). Die snelheid van die draer neem dus toe as die som van die kalsium- en natriumione aan die buitekant van die membraan toeneem, mits die verhouding $\{\text{Ca}^{2+}\}_0 / \{\text{Na}^+\}_0^2$ konstant bly.

Die presiese verklaring van die fyn beheermeganisme is nog on=duidelik. Die volgende afleidings kan egter met redelike seker=heid gemaak word.

Die draer word met Ca^{2+} en Na^+ -ione gelaai. Die Ca^{2+} en Na^+ kompeteer vir dieselfde bindingsplek. Dit geskied waarskynlik op dieselfde manier aan beide kante van die membraan.

Die draer is aan die buitekant van die membraan bykans versadig met die normale Na^+ en Ca^{2+} -konsentrasies, terwyl dit aan die binnekant ver van versadig is. Die affiniteit van die draer vir Na^+ is waarskynlik kleiner aan die binnekant van die membraan as aan die buitekant.

Omdat 'n kleiner fraksie van die draer aan die binnekant met Na^+ gelaai is, vind daar 'n netto transport van Ca^{2+} na buite plaas, hoofsaaklik as gevolg van Na^+ - Ca^{2+} -uitruiling. As die ekstrasellulêre $\{\text{Na}^+\}$ verlaag of die intrasellulêre $\{\text{Na}^+\}$ baie styg, akkumuleer Ca^{2+} in die sel. Die transport van die Ca^{2+} of Na^+ -gelaaide draer oor die membraan is elektroneutraal (Reuter, 1974). Dit word deur die volgende gestaaf:

- (a) 1 Ca^{2+} word vir 2 Na^+ uitgeruil.
- (b) veranderinge in die membraanpotensiaal het geen effek op die Na^+ -afhanklike Ca^{2+} -uitvloeï nie.

Aangesien die Ca^{2+} -uitvloeï teen 'n konsentrasiegradiënt geskied, moet dit 'n aktiewe proses wees. Die lae Q_{10} van 1,35 wat vir die Ca^{2+} -uitvloeï by marmotatria waargeneem is, en die waarneming dat 2,4-dinitrophenol geen afname in Ca^{2+} -uitvloeï tot gevolg het nie, toon aan dat die uitvloeï nie direk afhanklik is van energie uit ATP nie (Reuter & Seitz, 1968). Die energie vir die aktiewe uitvloeï van Ca^{2+} is waarskynlik geleë in die konsentrasiegradiënt van Na^+ oor die selmembraan. Die gradiënt word in stand gehou deur die Na^+ -pomp. ATP-afbraak is

dus indirek betrokke by die energieverskaffing, omdat dit vir die natriumtransport benodig word (Jundt et al., 1975). Die natriumafhanklike Ca^{2+} -uitvloeï vind by baie lae ATP konsentrasies plaas, soos aangetoon in gedialiseerde aksone. Dit is moontlik dat ATP die natriumgradiënt fasiliteer deurdat dit die affiniteite van Na^+ en Ca^{2+} vir die bindingsplek verhoog (Baker, 1972; Baker & Glitsch, 1973). Hier speel $\{\text{Na}^+\}_i$ 'n belangrike rol: Na^+ -uitvloeï verhoog in verhouding met 'n verhoging van die intrasellulêre Na^+ -konsentrasie (Glitsch et al., 1970).

2.3.1 Farmaka en chemiese stowwe

Die belangrike rol wat Ca^{2+} en Na^+ tydens die uitvloeï van Ca^{2+} en dus in die handhawing van selhomeostase speel, blyk ook uit eksperimente wat met verskillende farmaka gedoen is.

'n Verhoging in Ca^{2+} -uitvloeï vind plaas met die toediening van kafeïen of sianied. Die effek van kafeïen word toegeskryf aan 'n verhoogde Ca^{2+} -vrystelling vanaf die sarkoplasmiese retikulum en die effek van sianied as gevolg van 'n verhoogde vrystelling van Ca^{2+} vanaf die mitochondria (Jundt et al., 1975).

As die uitvloeï van Ca^{2+} geïnhibeer word deur die verwydering van die ekstrasellulêre Na^+ word kontraktuur verkry deurdat die verhoogde intrasellulêre Ca^{2+} -vrystelling die kontraktiele proteïene aktiveer (Jundt et al., 1975; Chapman & Miller, 1972).

Die verhoogde Ca^{2+} -uitvloeï word waarskynlik moontlik gemaak deur 'n volledige binding of oplading van die Ca^{2+} -draersisteem aan die binnekant van die membraan. In die teenwoordig=

heid van ekstrasellulêre Na^+ is die transportsisteen wat vir uitvloei verantwoordelik is, effektief genoeg om die spier ver=slap te hou tydens die vrystelling van Ca^{2+} vanaf intrasellulêre strukture. Die tempo van die uitvloei word, ook in die teenwoor=digheid van kafeïen, deur die ekstrasellulêre Na^+ -konsentrasie be=paal. Dit illustreer die effektiwiteit van die Na^+ - Ca^{2+} -uit=ruilingsisteen (Jundt et al., 1975).

Ook in die geval waar die vrystelling van Ca^{2+} vanaf die mito=chondria (deur toediening van sianied) baie hoog is, is die ge=paardgaande verhoogde Ca^{2+} -uitvloei effektief genoeg, met die gevolg dat die rustende spanning konstant bly (Jundt et al., 1975).

Die ionofoor X-537-A veroorsaak ook 'n verhoogde Ca^{2+} -vrystel=ling vanaf sowel die sarkoplasmiese retikulum as die mitochondria (Entman et al., 1972; Jundt et al., 1975). Dit het ook 'n ver=hoging in die Ca^{2+} -uitvloei tot gevolg. In hierdie geval word daar, anders as met kafeïen en sianied, 'n verhoging in die rustende spanning waargeneem. Die verklaring hiervoor is moont=lik 'n oorbelading van die Ca^{2+} -draersisteen deur Ca^{2+} .

X-537-A het ook ontkoppeling van oksidatiewe fosforilasie tot gevolg (Jundt et al., 1975). Die feit dat die spanning in die spier toeneem, kan egter eerder toegeskryf word aan die oorbe=lading van die Ca^{2+} -draersisteen as aan 'n afname in energie=voorsiening vir die uitvloeisisteen. Dit word gestaaf deur die feit dat die uitvloeisisteen slegs in 'n geringe mate van meta=boliese energie afhanklik is (Reuter & Seitz, 1968). 'n Meta=boliese inhibeerder het bykans geen effek op kalsiumuitvloei nie.

Uit bogenoemde kan afgelei word dat farmakologiese middels 'n verandering in die inotropiese toestand van die hart tot gevolg kan hê. Dit is ook bewys, byvoorbeeld deur die positiewe inotropiese werking van digitalis. Die uitwerking is waarskynlik die gevolg van 'n afname van die Ca^{2+} -uitvloei en/of 'n verhoogde vrystelling van Ca^{2+} uit die sarkoplasmiese retikulum of mitochondria (Klaus & Lee, 1969; Lee et al., 1970).

Om die inotropiese veranderinge as gevolg van farmaka beter te begryp is dit noodsaaklik om die eienskappe van die $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -uitruilmeganisme te ondersoek. Dit geld ook die inotropiese verandering as gevolg van veranderinge in die ekstrasellulêre Na^+ en K^+ -konsentrasies (kyk hoofstuk IV).

2.4 Kalsiuminvloei (kalsiumopname)

Daar is twee komponente van Ca^{2+} -invloei:

- (a) 'n elektrogene invloei gedurende depolarisasie van die selmembraan. Die invloei is verantwoordelik vir die stadige inwaartse stroom. {Die vinnige inwaartse stroom word gedra deur Na^+ } (Beeler & Reuter, 1970a & 1970b).
- (b) 'n elektroneutrale invloei wat tydens diastolie plaasvind en moontlik ook tydens sistolie (Glitsch et al., 1970; Reuter, 1974).

Uit die eksperimentele resultate wat met bogenoemde bevindings gepaard gaan, kan afgelei word dat die selmembraan tydens die aktiewe toestand meer deurlaatbaar is vir Ca^{2+} as tydens die rustoestand.

Spanningsklemmingseksperimente het aangetoon dat die elektro= gene invloed van Ca^{2+} tydens die platofase van die aksiepo= tensiaal geskied. Hieruit spruit die verskil in die koppe= ling tussen elektriese- en meganiese gebeure by die hart en skeletspier voort; by skeletspier dien die aksiepotensiaal slegs om die kontraktiele gebeure aan die gang te sit. Daar= enteen duur dit by die hartspier bykans net so lank as die kontraksiefase en speel dit 'n rol in die beheer van die groot= te en duur van die sametrekking. Dit verklaar ook die langer refraktêre periode by hartspier.

Bogenoemde is resultate wat nie met vloeieksperimente verkry kan word nie, omdat die verskillende fases van die aksiepo= tensiaal 'n te kort tydverloop het. ('n Soortgelyke probleem word ook onder *Resultate en Bespreking* genoem).

Die belangrike rol van Ca^{2+} in die geleiding van die aksiepo= tensiaal is ook vasgestel met eksperimente waartydens die Na^{+} - stroom met behulp van stowwe soos Tetrodoxin geblokeer is. Tydens so 'n blokkering van die Na^{+} -kanale kan 'n aksiepotensi= aal weer deur die byvoeging van Ca^{2+} -ione verleng word. (Reuter, 1973).

Die volgende eienskappe kan aan die elektroneutrale invloed van Ca^{2+} toegeskryf word:

- (a) die invloed word waarskynlik geaktiveer deur 2Na^{+} en 1Ca^{2+} aan die binnekant van die membraan. Tydens die invloed word 1Ca^{2+} vir 2Na^{+} uitgeruil.
- (b) Ekstrasellulêre Ca^{2+} is essensieel vir die invloed.
- (c) Kontraktuurvloei stowwe (byvoorbeeld 54 mM K-Tirode) het

'n toename in die Ca^{2+} -invloei tot gevolg.

Dit blyk dus of die uitvloei en elektroneutrale invloei van Ca^{2+} op dieselfde manier geaktiveer word.

2.5 Die invloed van die intrasellulêre natriumkonsentrasie op kalsiumvloei

'n Verhoging in die intrasellulêre Na^+ -konsentrasie het 'n toename in Ca^{2+} -opname en 'n afname in Ca^{2+} -uitvloei tot gevolg (Glitsch et al., 1970; Reuter & Seitz, 1968). Daar sal met ander woorde 'n styging in die intrasellulêre Ca^{2+} -konsentrasie plaasvind wat 'n verhoging in kontraktiliteit tot gevolg kan hê. Die intrasellulêre Na^+ kan onder andere verhoog word deur die tempo van stimulering te verhoog.

Die intrasellulêre Na^+ -konsentrasie is dus 'n belangrike skakel in eksitasie-kontraksiekoppeling. Behalwe dat 'n toename in die intrasellulêre Na^+ -konsentrasie 'n verhoogde kontraktiliteit tot gevolg kan hê, kan 'n verlaging in Na^+ ook 'n afname in kontraktiliteit tot gevolg hê. Die invloed van die intrasellulêre Na^+ op kontraktiliteit is dus toe te skryf aan sy invloed op die beheer van die intrasellulêre Ca^{2+} -konsentrasie.

Die volgende interafhanklikheid van die ekstrasellulêre en intrasellulêre Na^+ - en Ca^{2+} -konsentrasies kan gekonstrueer word (na aanleiding van die bespreking onder 2.2, 2.3 en 2.4): 'n Verhoogde $\{\text{Na}^+\}_i$ het 'n verhoogde Ca^{2+} -uitvloei tot gevolg; die gevolglike verhoogde $\{\text{Ca}^{2+}\}_o$ bevoordeel Ca_o^{2+} - Ca_i^{2+} -uitruiling en inhibeer Na^+ -uitvloei. 'n Toename in $\{\text{Na}^+\}_i$ bevoordeel Na_o^+ - Na_i^+ -uitruiling en inhibeer Ca^{2+} -uitvloei; die verhoogde $\{\text{Na}\}_i$ lei tot 'n toename in Na^+ -uitvloei; dit het tot gevolg dat meer

draers aan die buitekant van die membraan beskikbaar is om Ca^{2+} inwaarts te vervoer (Fozzard, 1977).

Die Na^+ -konsentrasiegradiënt oor die selmembraan verskaf ook klaarblyklik die energie vir die vervoer van Ca^{2+} teen sy konsentrasiegradiënt (Jundt et al., 1975). Die intrasellulêre Ca^{2+} -konsentrasie is dus afhanklik van die Na^+ -pomp in die selmembraan.

2.6 Die fisiologiese rol van kalsiuminvloei en kalsiumuitvloei

Die hoeveelheid Ca^{2+} beskikbaar vir aktivering van die kontraktiliele proteïene kan verander word deur enige meganisme wat die balans tussen invloei en uitvloei verander. Byvoorbeeld: post-ekstrasistoliese potensiasie verhoog kontraktiliteit deur 'n verhoogde elektrogeniese Ca^{2+} -invloei (Rosin & Farah, 1955). Daar is dus meer Ca^{2+} intrasellulêr beskikbaar vir aktivering van die kontraktiliele proteïene. Net so kan 'n verlaging in die Ca^{2+} -uitvloei meer Ca^{2+} beskikbaar stel vir aktivering van kontraktsie.

Die afhanklikheid van spanningsontwikkeling van die ekstrasellulêre Na^+ -konsentrasie asook van die ekstrasellulêre Ca^{2+} -konsentrasie is in resente literatuur bevestig (Miller & Moisesescu, 1976). Die afhanklikheid van kalsiumvloei van die verhouding $\{\text{Ca}^{2+}\}_o / \{\text{Na}^+\}_o^2$ impliseer dat spanningsontwikkeling ook moontlik deur dié verhouding beïnvloed word. Dit is dus myns insiens belangrik om kontraktiliteitsverskynsels met behulp van Ca^{2+} -vloei-bepalings te evalueer.

Slotopmerking: Gedurende verslapping is die affiniteit van die Na-Ca-uitruilingsisteem (vir Ca^{2+}) moontlik groter as die affiniteit van troponien vir Ca^{2+} (Jundt et al., 1975). Dieselfde geld waarskynlik ten opsigte van die affiniteit van die sarkotubulêresisteem, met die gevolg dat Ca^{2+} opgeneem word. Repolarisasie van die selmembraan en sarkoplasmiese retikulum het moontlik die toename in affiniteit vir Ca^{2+} tot gevolg.

HOOFSTUK III

3. METODE

3.1 Spierpreekaraat

Papilêr- en trabekulêrspiertjies uit beide ventrikels van marmotharte is gebruik.

Nadat die marmot gedood is deur 'n hou agter die kop, is die hart vinnig uitgesny en in 'n perfusiebadjie met geoksigineerde Tirodeoplossing by 37°C geplaas. Die ventrikels is so gou en vinnig moontlik onder 'n stereomikroskoop oopgedissekteer om doeltreffende oksigenasie te verseker.

Die spiertjies is versigtig losgedissekteer en met behulp van disseksienaalde in 'n effens uitgerekte toestand in die disseksiebad gehou.

Deur die hele disseksietyd is die spiertjies gestimuleer teen 'n tempo van 60/minuut, by 'n potensiaalverskil van 1½ maal die drempelwaarde.

Nadat die geskikte hoeveelheid spiertjies uitgedissekteer is, is hulle aan die hefboompies wat in die kalsiumvloei-eksperimente gebruik is, vasgesit.

Daar is soveel spiertjies moontlik van homogene vorm en grootte uit dieselfde hart gedissekteer, eerder as om spiertjies uit

verskillende harte vir dieselfde eksperiment te gebruik. Spiertjies met 'n deursnee van 0,7 tot 1,3 millimeter is gebruik.

3.2 Kalsiuminvloei (kalsiumopname)

Net voor die spiertjies in die Tirode- ^{45}Ca -oplossing geplaas is, is dit vir 1 uur gestabiliseer in 0 mM Na^+ -Tirode by die eksperimente soos aangedui onder die betrokke figure in hoofstuk IV, en vir 1 uur gestabiliseer in normale Tirode by die eksperimente soos aangedui onder die betrokke figure in hoofstuk IV.

Die spierpreparate is daarna elkeen in 'n afsonderlike proefbuis met 1 ml Tirode- ^{45}Ca -oplossing geplaas om ^{45}Ca op te neem. Tydens die opnametyd is die spiertjies nie gestimuleer nie.

Na verloop van die opnametyd is die spiertjies uitgehaal en vir 20 minute in 'n 0 Na 0 Ca 10 mM LaCl_3 -oplossing geplaas om ekstrasellulêre- en membraangebonde ^{45}Ca te verwyder. By sommige eksperimente is laasgenoemde stap uitgelaat. Dit word aangedui in die resultaatbespreking (Hoofstuk IV).

Vervolgens is die spiertjies versigtig losgemaak van die hefboompies, liggies geklad, geweeg en oornag gedroog by 100°C .

Na die droging is die spiertjies veras deur die byvoeging van 0,5 ml van 'n 1:1 mengsel van gekonsentreerde salpeterzuur en gekonsentreerde perchloorsuur en geleidelike verhitting tot by 210°C .

Die as is opgelos in 1 ml 0,1 N HCl plus 2 ml 96% etanol.

'n 0,5 ml monster van bogenoemde is by 10 ml sintillasievloeistof gevoeg, geskud en die radioaktiwiteit is in 'n vloeistofsintillasieteller bepaal (Reuter & Seitz, 1968).

^{45}Ca -opname is aangetoon as die tellings per minuut per milligram spier. Dit is uitgesit op die y-as teenoor die opname-tyd op die x-as op liniêre grafiekpapier.

3.3 Totale kalsium

Vir die bepaling van die totale Ca inhoud in die spier is dieselfde metode gevolg in die bereiding van die spierpreparaat soos beskryf in 3.1. 3 preparate is direk na disseksie veras soos beskryf in 3.2 en die as is opgelos in 1 ml 0,1 N HCl.

Die ander spierpreparate is daarna vir 60 minute elkeen afsonderlik in 0 mM $\text{Na}^+\text{-Tirode}$ geplaas. Daarna is 4 preparate elkeen afsonderlik in 'n 14 mM $\text{Na}^+\text{-Tirode}$ -oplossing geplaas vir 60 minute. 4 ander preparate is in ander proefbuisse met 0 mM $\text{Na}^+\text{-Tirode}$ geplaas. Die orige 4 preparate is veras en die as is opgelos in HCl soos beskryf in 3.2.

Die totale Ca in die spier is bepaal na verassing soos beskryf in 3.2 met behulp van 'n atoomabsorpsiespektrofotometer.

Totale Ca is dus bepaal by 3 preparate op tyd 0, 4 preparate op tyd 60 minute by 0 mM $\text{Na}^+\text{-Tirode}$, 4 preparate op tyd 120 minute by 0 mM $\text{Na}^+\text{-Tirode}$ en 4 preparate op tyd 120 minute by 14 mM $\text{Na}^+\text{-Tirode}$ (figuur 7, bladsy 47).

3.4 Kalsiumuitvloei

Die spierpreparate is voorberei soos uiteengesit in 3.1.

Vervolgens is elke preparaat afsonderlik in 1 ml ^{45}Ca -Tirode-oplossing geplaas vir 1 uur. Tydens die 1 uur opname is die preparaat gestimuleer teen 60 stimulasies per minuut by 'n potensiaalverskil van $1\frac{1}{2}$ maal die drempelwaarde. Die preparate is tydens die hele eksperiment geoksigineer met suiwer mediese suurstof.

Na die opnametyd is die preparate vir 10 minute gespoel in 'n Tirode-oplossing sonder ^{45}Ca .

Daarna is elke preparaat afsonderlik in 'n Tirode-oplossing geplaas vir 'n bepaalde tyd. Die $\{\text{K}^+\}$ en $\{\text{Na}^+\}$ van die oplossings is verander soos aangedui in figure 3 en 10 bladsye 39 en 51.

Voor die spierpreparate oorgeplaas is na die volgende proefbuis is dit vinnig gespoel in 'n ^{45}Ca -vrye Tirode-oplossing.

Die ^{45}Ca afgegee deur elke spier is bepaal deur die inhoud van die proefbuis elkeen afsonderlik by 10 ml Aquagell in 'n sintillasieflessie te voeg. Elke proefbuis is ook gespoel met 1 ml gedistilleerde water. Die 1 ml is ook by die inhoud van die sintillasieflessies gevoeg en die radioaktiwiteit is bepaal in 'n vloeistofsintillasieteller.

^{45}Ca -uitvloei is aangetoon as die tellings per minuut, teenoor die tyd op halflogaritmiese grafiekpapier.

3.5 Kontraktuur

Vir die kontraktuureksperimente is slegs papilêrspiertjies uit die regterventrikel van marmotharte gebruik.

Die spiertjies is uitgedissekteer soos beskryf in 3.1. Aan een van die spiertjies wat uitgedissekteer is, is 'n dun platinadraadjie versigtig aan die een punt van die spiertjie vasgemaak. Die ander punt van die spiertjie is in 'n klein perfusiebadjie vasgeknyp en die perfusiebadjie is in sy houer geplaas. Sodra die badjie in die houer is, is geperfuseer met suurstofryke Tirode. Die lussie aan die ander punt van die draadjie is aan 'n Statham isometriese spanningsomsetter gehaak wat op 'n mikromanipulator gemonteer is. Die spanningsomsetter is via 'n versterker aan 'n Watanabe potensiometriese skrywer gekoppel.

Met behulp van die mikromanipulator is die spiertjie stywer gespan tot die maksimum isometriese kontraksie op die skrywer waargeneem kon word. Hierna is die mikromanipulator teruggedraai sodat die spanning op die spiertjie verminder is, totdat ongeveer 75% van die maksimale uitwyking op die skrywer aangetoon is. Daar is vir ongeveer 15 minute by normale Tirode geregistreer om te verseker dat die basislyn 'n stabiele horisontale verloop het. Daarna is met die omskakelings na ander oplossings begin. Die spiertjie is deurgaans gestimuleer teen 'n tempo van 60 stimulasies/minuut.

3.5.1 Perfusie-apparaat

Die perfusievloeistowwe is op dieselfde hoogtes gehou sodat perfusie van die verskillende oplossings teen dieselfde snel-

hede plaasgevind het. Suiwer mediese suurstof is voortdurend teen 'n konstante snelheid deur die perfusievloeistowwe geborrel. Vanaf elke Erlen Meyerfles waarin die oplossing gehou word verloop 'n politeenbuisie na 'n kondensator waarvan die temperatuur deur 'n termostaat by 37°C konstant gehou word. Vanaf die kondensator verloop die politeenbuisies na die houer van die perfusiebadjie, deur sy wand, na die bokant van die houer, waar die perfusievloeistof uitdrup om die perfusiebadjie van bo af te vul. Tussen die kondensator en die perfusiebadjie is daar aan elke buisie 'n kraantjie wat elektries oop en toegemaak kan word. Reg teenoor mekaar in die wand van die perfusiebad se houer verloop ook die elektriese draadjies vanaf 'n stimulator waarmee die spiertjie gestimuleer is.

Daar is voortdurend op die volgende gelet:

- (a) dat die Erlen Meyerflesse tot bo gevul is,
- (b) O_2 teen 'n konstante snelheid deurborrel,
- (c) geen lugborrels in die perfusiesisteem is nie,
- (d) die kraantjies oop- en toemaak,
- (e) die vlak van perfusievloeistof aan die bokant van die badjie konstant bly en nie aan die spanningsomsetter raak nie,
- (f) die temperatuur in die perfusiebadjie 37°C is, dit wil sê, die temperatuur van die termostaat by ongeveer 39°C is, omdat hitte aan die omgewing afgegee word met die verloop van die vloeistof deur die buissisteem.

(g) die perfusiesisteen met gedistilleerde water gespoel word na elke eksperiment.

3.6 Reagense

Die normale Tirode-oplossing bestaan uit: 1,8 mM CaCl_2 , 138 mM NaCl, 0,5 mM MgCl_2 , 5,4 mM KCl, 12 mM Trischloried 2 gm per liter glukose. Die pH van die oplossing is met gekonsentreerde soutsuur op 7,4 ingestel.

Die osmolariteit van die oplossing met 'n verlaagde NaCl, is konstant gehou deur die byvoeging van 'n ekwivalente hoeveelheid Trischloried. In die geval waar die KCl-konsentrasie verhoog is, is die Trischloried ooreenkomstig verlaag, byvoorbeeld: 14 mM NaCl-54 mM KCl-Tirode bestaan uit 14 mM NaCl, 54 mM KCl, 1,8 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2 , 87,4 mM Trischloried, 2 gram per liter glukose. Met ander woorde die konsentrasie van NaCl, KCl en Trischloried is nog soos in die geval van normale Tirode, 155,4mM.

3.7 Statistiek

Die standaardafwyking van die gemiddelde is bepaal waar aangedui op die figure.

HOOFSTUK IV

4. RESULTATE EN BESPREKING

4.1 Inleiding

Om die verband tussen die membraanpotensiaal en kontraktiliteit te bestudeer, kan moeilik van die aksiepotensiaal gebruik gemaak word, vanweë regeneratiewe depolarisasie en repolarisasie; dit wil sê: die aksiepotensiaal kan nie op 'n sekere vlak gestop word, om die verband tussen meganiese krag en membraanpotensiaal te bepaal nie.

'n Vergelyking van oombliklike waardes van kontraksiekrag en die membraanpotensiaal sou nie veel oplewer nie, omdat beide hierdie parameters deur tydsafhanklike prosesse beïnvloed word. Die deurlaatbaarheid van die selmembraan kan byvoorbeeld nie oombliklik van een waarde na 'n ander verander nie. Volgens die Hodgkin-Huxley model word die deurlaatbaarheid van die selmembraan van senuweevesels beheer deur membraanhekke wat sekere tydskonstantes het vir oop- en toemaak (Hodgkin en Huxley, 1952). Net so word kontraktiliteit bepaal deur tydsafhanklike prosesse: so kan byvoorbeeld genoem word dat die visko-elastiese element veroorsaak dat die spanning oor die dwarsbrûe geleidelik oorgedra word na die uiteindes van die spier.

Om tydsafhanklike prosesse, soos byvoorbeeld die inwaartse Ca^{2+} -stroom tydens depolarisasie (Beeler & Reuter, 1970a en 1970b) in ag te neem, word daar van spanningsklemming gebruik

gemaak. Die membraanpotensiaal word op 'n sekere vlak geklem en die tydsafhanklike verandering in die ione-stroom en kontraktiliteit word waargeneem. Deur die hele potensiaal=omvang van die aksiepotensiaal te dek met herhaalde spannings=klemming kan die verlangde verbande nagegaan word.

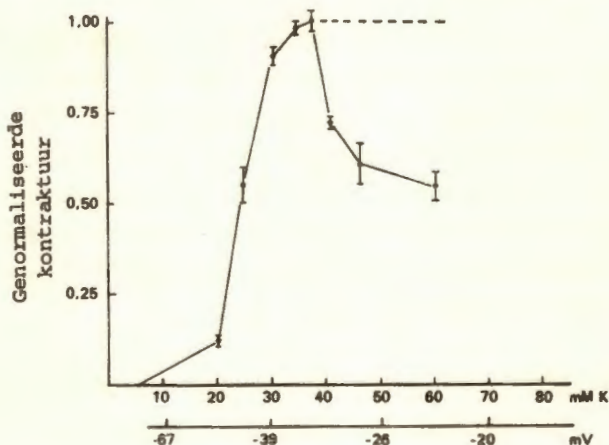
Spanningsklemming is tegnies baie moeilik en het die nadeel dat dit feitlik onmoontlik is om dit eenvormig in hartspier toe te pas (Johnson en Lieberman, 1971).

'n Ander metode is depolarisasie deur 'n verhoging in die ekstrasellulêre K^+ -konsentrasie (Niedergerke, 1956b). Hierdie depolarisasie is eenvormig oor relatief lang tye so=dat kaliumkontraktuur verkry word, en kontraktiliteit bestudeer kan word. Ook hier is daar nadele, naamlik dat vin=nige membraanpotensiaalveranderinge nie moontlik is nie en dat ioonverskuiwings oor die selmembraan moontlik is, wat die natuurlike milieu kan versteur.

'n Verhoging in die ekstrasellulêre K^+ is nie noodwendig on=fisiologies nie, want met repolarisasie vloei baie K^+ uit die selle en as gevolg van die diffusiegrense styg die K^+ -konsentrasie hoog in die onmiddellike omgewing van die selmembraan. Hierdie verhoging is egter van korte duur in vergelyking met die verhoging tydens K^+ -kontraktuur. Vir ioon=vloeibepalings met behulp van isotope is 'n verhoging in die ekstrasellulêre K^+ -konsentrasie die enigste praktiese metode om depolarisasie te bewerkstellig.

4.2 Die verband tussen die ekstrasellulêre kaliumkonsentrasie (membraanpotensiaal) en kontraktuur (kontraktiliteit)

Eksperimente wat plaaslik gedoen is met marmotte stem ooreen met sekere bevindings in die literatuur. Hierdie bevindings toon eers 'n toename en dan 'n afname in kontraktiliteit, indien die membraanpotensiaal van die ruspotensiaal ($K^+ = 5,4 \text{ mM}$) verander word na waardes groter as -30 mV ($K^+ > 40 \text{ mM}$) (Allers, 1972; Scholz, 1969; Van Wyk, 1973; Van der Walt & Allers, 1973).

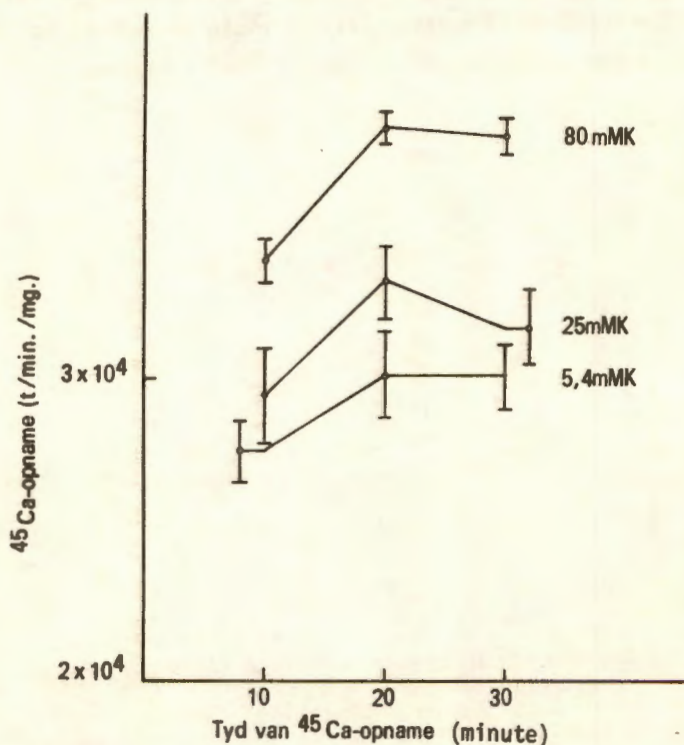


Figuur 1

Genormaliseerde waardes van kaliumkontraktuur as 'n funksie van die ekstrasellulêre kaliumkonsentrasie en die membraanpotensiaal (Allers, 1972)

Om die toename en afname in kontraktuur te verklaar, is ^{45}Ca -uitvloei en ^{45}Ca -opname by verskillende K^+ -konsentrasie bepaal. 'n Verhoging in kontraktsiekrag hou verband met 'n verhoging in die intrasellulêre Ca^{2+} -konsentrasie en 'n verhoging in kontraktsiekrag met 'n verlaging in die intrasellulêre Ca^{2+} -konsentrasie by hartsier.

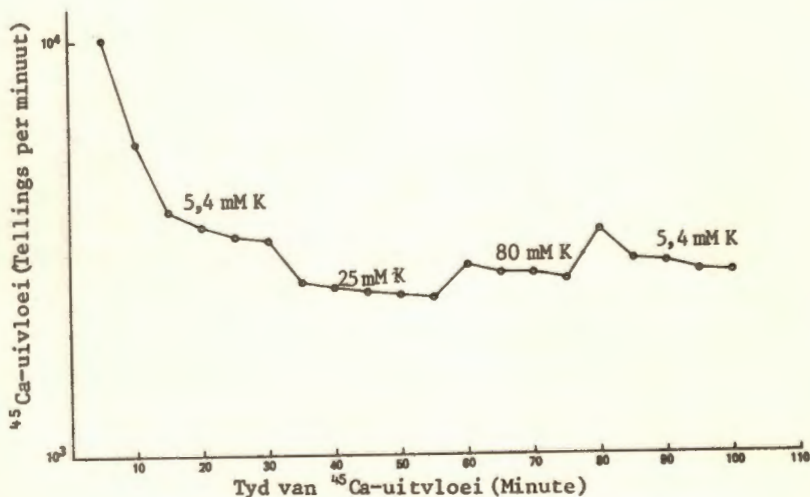
'n Toename in ^{45}Ca -opname word verkry met 'n verhoging (van die $[\text{K}^+]$ in die Tirode) van 5,4 mM na 25 mM, maar ook met 'n verhoging van 25 mM na 80 mM (figuur 2). Gevolglik sal eksperimente met ^{45}Ca -opname net die verhoging in kontraktiliteit van 5,4 mM na 25 mM kan verklaar, maar nie die afname bokant 25 mM nie.



Figuur 2

^{45}Ca -opname as 'n funksie van tyd by verskillende ekstrasellulêre kaliumkonsentrasies (80, 25 en 5,4 mM K). Elke punt verteenwoordig die rekenkundige gemiddelde van 5 waardes

Wat die ^{45}Ca -uitvloei betref is daar 'n afname in uitvloei met 'n verhoging van $5,4 \text{ mM K}^+$ na 25 mM K^+ . Met 'n verdere verhoging van 25 mM na 80 mM , is daar egter 'n styging in ^{45}Ca -uitvloei by al die preparate waargeneem (figuur 3, Tabel 1). Laasge-noemde verklaar waarskynlik die afname in kontraktiliteit bo- kant 38 mM K^+ , omdat 'n toename in ^{45}Ca -uitvloei waarskynlik ge- paard gaan met 'n afname in kontraksiekrug, vanweë die feit dat daar dan minder Ca^{2+} beskikbaar is vir die aktivering van die kontraktiliese proteïne.



Figuur 3

^{45}Ca -uitvloei as 'n funksie van die tyd by ver- skillende ekstrasellulêre kaliumkonsentrasies. (Sien ook tabel 1). Die figuur is 'n tipiese voorstelling van 5 eksperimente wat met marmot- papilêrspier gedoen is

Eksperiment	Persentasieverandering		
	5,4 mM - 25 mM	25 mM - 80 mM	80 mM - 5,4 mM
1	-24	+16	+16
2	-40	+90	+35
3	-25	+55	+25
4	-45	+58	+30
5	-22	+37	+30
$\bar{R}$	-31,2%	+51,2%	+27,2%

Tabel 1

Persentasie verandering in ^{45}Ca -uitvloei met verandering in die K^+ -konsentrasie van die perfusiemedium

- dui 'n %-afname aan
- + dui 'n %-toename aan

Soos uit die literatuuroorsig blyk, is daar baie faktore wat die intrasellulêre Ca^{2+} -konsentrasie en dus die kontraktiliteit beïnvloed, byvoorbeeld die sarkoplasmiese retikulum, mitochondria en die sarkolemma. Dit is dus eksperimenteel baie moeilik om kwantitatiewe verbande na te gaan, as al hierdie veranderlikes nie gelyktydig bepaal kan word nie.

Om te verseker dat die preparate nie vir lang tye aan hoë K^+ -konsentrasies blootgestel is nie, verskil die ioonsamestellings van die eksperimentele opstellings, wat gebruik is vir die resultate soos aangetoon in figuur 1, met die van figuur 2 en figuur 3. Hierdie verskille het egter geen direkte invloed op die interpretasie van die resultate nie, aangesien daar slegs gesoek is na 'n kwalitatiewe verandering, dit wil sê:

na of 'n toename in ^{45}Ca -uitvloei, of 'n verminderde opname met 'n verhoging in die ekstrasellulêre K^+ -konsentrasie.

Eersgenoemde is dus wel waargeneem wat hipotese I ondersteun, naamlik dat die uitvloei van Ca^{2+} deur die sarkolemma verantwoordelik is vir die eienskappe van die verband tussen die kontrak-siekrag en die membraanpotensiaal.

Dit is egter nie moontlik om die invloed van Ca^{2+} -opname uit te sluit nie, veral tydens die toename in kontraktuur met 'n verho-ging in die K^+ -konsentrasie van 5,4 mM na 38 mM. Dit kan wel gesê word dat die uitvloei die opname oorheers met 'n verhoging van die K^+ -konsentrasie bokant 38 mM. Die toename in uitvloei met 'n verandering van 80 mM na 5,4 mM (figuur 3), wat aanlei-ding gee tot 'n verlaging in die intrasellulêre Ca^{2+} -konsentra-sie, voorspel moontlik 'n afname in kontrak-siekrag soos waarge-neem by a in figuur 4. Dit is nie 'n volgehoue afname in kontraktuur nie waarskynlik as gevolg van perfusie met 0 mM Na^+ .



Figuur 4

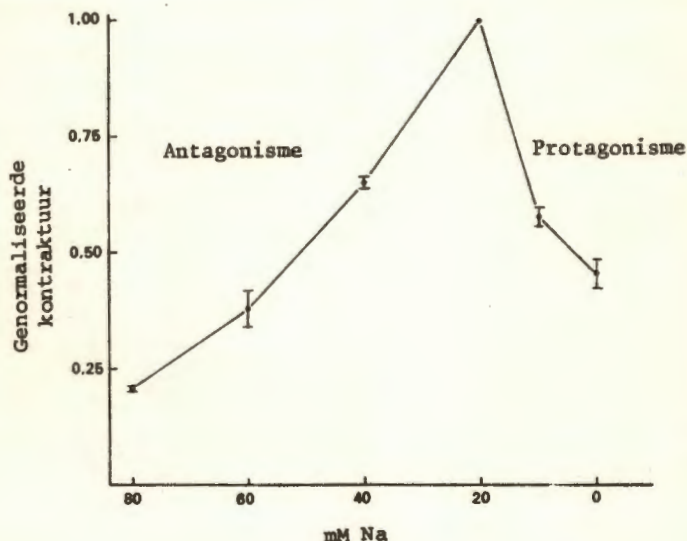
Die invloed van veranderinge in die ekstrasel-lulêre natriumkonsentrasie op kontraktuur by 5,4 mM K^+ en by 54 mM K^+ . 'n Verandering van 0 Na^+ na 14 mM Na^+ het 'n afname in kontraktuur by 5,4 mM K^+ asook 54 mM K^+ , tot gevolg

In die literatuur word dikwels 'n verband tussen kontraksie=krag en K^+ -konsentrasie (membraanpotensiaal) aangetoon, sodanig dat die kontraksie=krag 'n plato bereik, of selfs hoër styg, by K^+ groter as 40 mM (met ander woorde die stippellyn in figuur 1) (Anderson & Edman, 1974; Gibbons & Fozzard, 1971; Hodgkin & Horowicz, 1960). Vanweë die gebruik van verskillende eksperimentele opstellings, perfusiemedie en proefdiere is dit moeilik om resultate en literatuur met mekaar te vergelyk. Eksperimentele resultate van 'n projek gedoen in die Instituut vir Fisiologiese Navorsing van die P.U. vir C.H.O. het aangetoon dat daar skynbaar spesieverskille bestaan tussen marmotharte en skaapharte (Van Wyk, 1973). Skaapharte vertoon slegs 'n geringe afname in kontraktiliteit bokant 40 mM K^+ . 'n Praktiese implikasie van afname in kontraktiliteit bokant 40 mM K^+ (-30 mV) is dat dit die moontlikheid skep van kontraksie tydens repolarisasie. Kontrakisie gedurende repolarisasie is dan ook deur Foulks et al. (1973) aangetoon. Onder normale fisiologiese toestande het hierdie moontlikheid waarskynlik nie veel betekenis nie, tensy dit dien as 'n potensieëring van die volgende kontrakisie. Dit kan egter wel 'n rol speel by 'n abnormale verskynsel, byvoorbeeld by na-kontraksies, wat dikwels verkry word in die teenwoordigheid van katesjolamienes.

Samevattend kan gesê word dat die afname in kontraktiliteit (figuur 1) by hoër K^+ -konsentrasies moontlik verklaar kan word deur 'n verhoogde Ca^{2+} -uitvloei. Die aanhoudende depolarisasie van die selmembraan het moontlik 'n intrasellulêre oorversadiging van Ca^{2+} tot gevolg, wat aanleiding kan gee tot 'n verhoogde Ca^{2+} -uitvloei.

4.3 Die verband tussen die ekstrasellulêre natriumkonsentrasie en kontraktuur

Die anormale verskynsel van protagonisme (Busselen & Carmeliet, 1973; Allers, 1972) naamlik die toename in kontraksiekras as die ekstrasellulêre Na^+ -konsentrasie van 0 na 14 mM verhoog word, is 'n verskynsel wat eers lank na die bekende Na^+ - Ca^{2+} -antagonisme beskryf is (Lüttgau & Niedergerke, 1958).



Figuur 5

Die invloed van die ekstrasellulêre natriumkonsentrasie op kaliumkontraktuur (Allers, 1972)

Die verskynsel van antagonisme word kortliks soos volg opgesom: 'n afname in kompetisie van Na^+ vir die Ca^{2+} -draer, word as die onderliggende rede beskou vir die toename in meganiese spanning, wat met 'n verlaging van die ekstrasellulêre Na^+ -

konsentrasie verkry word. Die afname in kompetisie, het 'n toename in Ca^{2+} opname tot gevolg, wat 'n verhoogde kontraktuur kan veroorsaak (Niedergerke, 1963 a).

'n Eerste moontlike verklaring vir antagonisme is 'n verhoogde Ca^{2+} -opname wat deur die sarkolemma plaasvind (Busselen & Van Kerkhove, 1975). Dit is ook aangetoon by senuweevesels dat Ca^{2+} -opname toeneem tot by 'n maksimum waarde, met 'n verhoging van die ekstrasellulêre Na^+ van 0 na normale konsentrasies (Baker et al., 1969).

'n Tweede moontlike verklaring vir antagonisme is dat 'n toename in die Ca^{2+} -vrystelling vanaf intrasellulêre store plaasvind. Die verklaring word ondersteun deur die waarneming dat as die Ca^{2+} -opname deur MnCl_2 of LaCl_3 geblokkeer word, 'n kontraktuur verkry word met verhoging van 0 na 14 mM Na^+ in die perfusiemedium (Busselen & Carmeliet, 1973). Dit kan dus beteken dat die intrasellulêre Na^+ 'n belangrike rol speel in die regulering van die intrasellulêre Ca^{2+} -konsentrasie vanuit intrasellulêre strukture by lae ekstrasellulêre Na^+ -konsentrasies. Dit impliseer verder dat die invloed van Ca^{2+} nie onontbeerlik is vir die vrystelling van Ca^{2+} uit die sarkoplasmiese retikulum of mitochondria, of vir die inhibering van Ca^{2+} -binding aan dié intrasellulêre strukture nie.

Dié hipotese word verder in die projek nagegaan met hoofsaaklik marmothartspiertjies as preparaat.

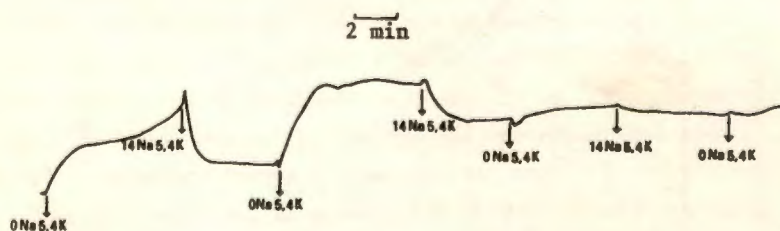
Volgens Busselen & Carmeliet (1973) vind geen beskadiging van spierpreparate plaas met etlike ure blootstelling aan 0 Na^+ -Tirode nie. Die uitspraak is in teenstelling met eie gevolgtrekkings en ook met uitsprake in die literatuur (kyk Hoof-

stuk V). Busselen & Carmeliet (1973) baseer hul uitspraak op die waarneming van kontraksies met veldstimulasie, terwyl 'n beter kriterium vir beskadiging as gevolg van 0 Na^+ -perfusie eerder kontraksies met 'n diskrete drempel sal wees, omdat die drempelwaarde beïnvloed word deur veranderings by die sarkomlemma. In bogenoemde outeurs se eksperimente neem kontraktuur by 0 Na^+ ook, soos in eie waarnemings, met die tyd af.

Daar bestaan 'n teenstrydigheid tussen die resultate met isotooptegnieke verkry en resultate met spanningsklemming verkry, wat Ca^{2+} -opname betref. Met behulp van die isotoopstudies kan 'n duidelike verhoging in die ^{45}Ca -opname waargeneem word by 'n verlaging van die Na^+ -konsentrasies, terwyl 'n toename in die stadige inwaartse stroom nie waargeneem kan word met spanningsklemtegnieke by lae ekstrasellulêre Na^+ nie. (Reuter, 1973 en 1974). Dit wil sê die stadige inwaartse stroom word nie deur lae ekstrasellulêre Na^+ geaffekteer nie. Die stadige inwaartse stroom word as verteenwoordigend van die elektrogeniese inwaartse Ca^{2+} -beweging beskou (Beeler & Reuter, 1970a, 1970b). Wendt & Langer (1977) beweer dat die vervoer van Ca^{2+} en Na^+ , deur die draer, elektroneutraal is en dus nie deur spanningsklemtegnieke waargeneem sal word nie. Daarenteen is gevind dat daar wel 'n korrelasie bestaan tussen spanningsontwikkeling en die stadige Ca^{2+} -stroom, soos waar geneem met spanningsklemming, alhoewel sekere komponente van die Ca^{2+} -stroom wel elektroneutraal mag wees. Laasgenoemde spanningsontwikkeling as gevolg van 'n toename in die Ca^{2+} -stroom, vind egter plaas as die Ca^{2+} -stroom *gestimuleer* word deur 'n verhoging in die ekstrasellulêre $\{\text{Ca}^{2+}\}$. Die spanningsontwikkeling is dus in hierdie geval afhanklik van die ekstrasellulêre Ca^{2+} en nie van ekstrasellulêre Na^+ nie.

Busselen & Carmeliet (1973) stel die adaptasie van die prepa-
 raat vir geruime tyd by 0 Na^+ as 'n voorwaarde vir die waar-
 neming van protagonisme. In die eerste reeks eksperimente is
 $1\frac{1}{2}$ uur geadapteer en in die tweede reeks 1 uur, voordat die Na^+
 in die perfusiemedium van 0 na 14 mM verander is om die toe-
 name in kontraktuur te verkry. Volgens hierdie outeurs is dit
 by hartpreparate van paddas, honde, koeie, katte en goudvisse
 verkry.

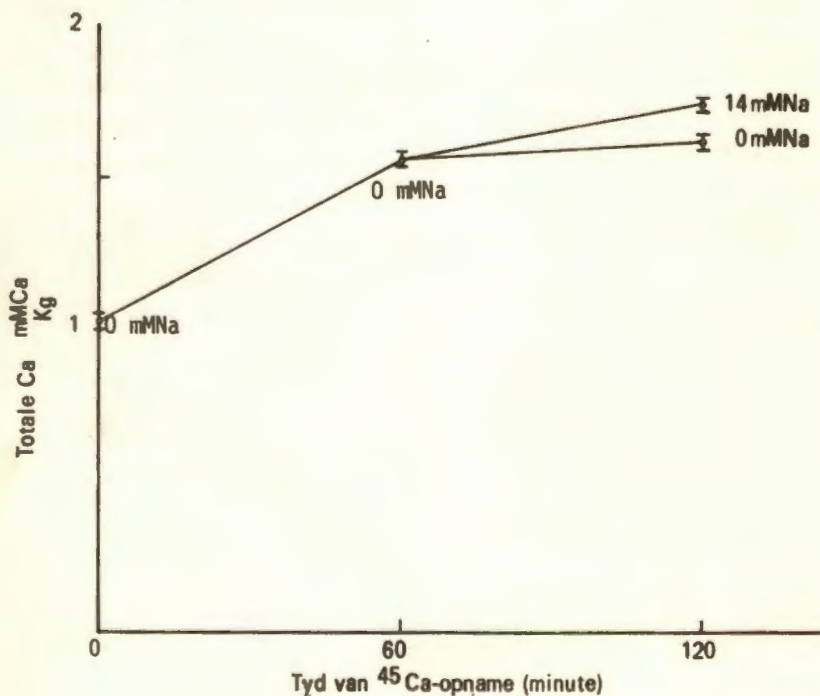
'n Herhaling plaaslik van die prosedure by marmothartspierpre-
 parate vertoon presies die teenoorgestelde. Met 'n verhoging
 van 0 na 14 mM Na^+ word 'n afname in kontraktuur waargeneem, en
 met 'n verlaging van 14 mM Na^+ na 0 Na^+ word 'n toename in
 kontraktuur verkry (figuur 6). Dit wil sê geen protagonisme
 word aangetoon onder dieselfte eksperimentele omstandighede as
 die van Busselen & Carmeliet (1973) nie. Die afname en toename in
 kontraktuur word kleiner met die tyd.



Figuur. 6

Die invloed van die ekstrasellulêre natriumkon-
 traktuur by $5,4 \text{ mM K}$ op kontraktuur

Aangesien Busselen et al., (1973 en 1975) se resultate gestaaf word deur 'n toename in Ca^{2+} -opname met verhoging in die ekstrasellulêre Na^+ van 0 na 14 mM, is verwag dat in die geval van marmothartpreparate daar 'n afname in die Ca^{2+} -opname sou wees. Dit is egter nie gevind nie, soos blyk uit figuur 7 wat totale Ca in die spier uitbeeld. Dit wil sê die gesamentlike effek van Ca^{2+} -invloei en Ca^{2+} -uitvloei by 14 mM Na^+ het 'n groter hoeveelheid Ca^{2+} in die spier tot gevolg as by 0 Na^+ . Die resultaat is soortgelyk aan resultate van Busselen et al. (1973 en 1975).

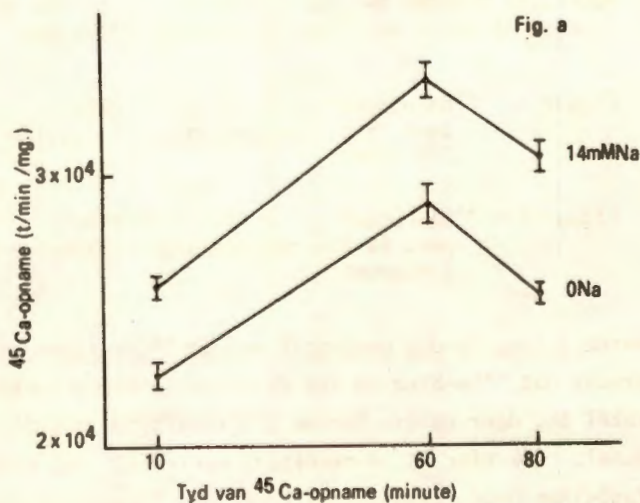


Figuur 7

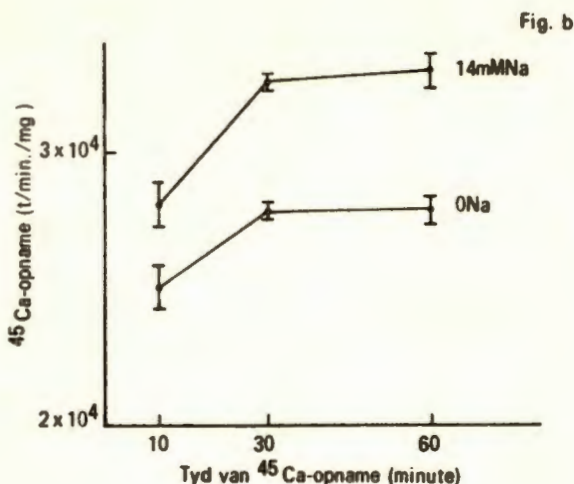
Die totale kalsium van die spier by 14 mM Na^+ en by 0 Na^+ as 'n funksie van die tyd soos bepaal met die atoomabsorpsiespektrofotometer

Dit ondersteun dus die verskynsel van protagonisme wat deur bogenoemde outeurs met kontraktuureksperimente verkry is, maar verklaar oënskynlik nie die teenstrydige afname in kontraktuur wat met die verandering van 0 na 14 mM ekstrasellulêre Na^+ verkry is nie (figuur 6).

Indien eenrigtingvloei ondersoek word deur middel van ^{45}Ca -opname (^{45}Ca -binding aan die sarkolemma ingesluit) word ook geen afname gevind met die verhoging in die ekstrasellulêre Na^+ -konsentrasie van 0 na 14 mM nie. Weer eens dui hierdie resultaat op protagonisme, alhoewel 'n afname in kontraktuur verkry word by marmothartspiertjies. By die eksperimente is daar nie in LaCl_3 -Tirode gespoel na die ^{45}Ca -opname gedoen is nie. Die ekstrasellulêre Ca^{2+} is met ander woorde nie verplaas nie. Die eksperimente is vir 1 uur vooraf by 0 Na^+ -Tirode gestabiliseer.



Figuur 8a



Figuur 8b

^{45}Ca -opname by 14 mM Na^+ en 0 Na^+ as 'n funksie van die tyd. In die eksperiment is daar nie in 'n LaCl_3 -oplossing gespoel na die opname nie. Voor die opname is vir 1 uur in 0 Na^+ -Tirode geadaptêr

Figuur a: ^{45}Ca -opname by 10, 60 en 80 minute. Elke punt is die rekenkundige gemiddelde van 3 waardes.

Figuur b: ^{45}Ca -opname by 10, 30 en 60 minute. Elke punt is die rekenkundige gemiddelde van 4 waardes

'n Verdere stap in die ondersoek was om ^{45}Ca -opname sodanig te ondersoek dat ^{45}Ca -binding aan ekstrasellulêre strukture uitgeskakel is, deur nā die opname die spiertjies in LaCl_3 -Tirode te spoel. Ook hier is 'n resultaat verkry wat die effek van antagonisme ondersteun, naamlik dat die ^{45}Ca -opname hoër is in 14 mM Na^+ -Tirode as in 0 Na^+ -Tirode (figuur 8b).

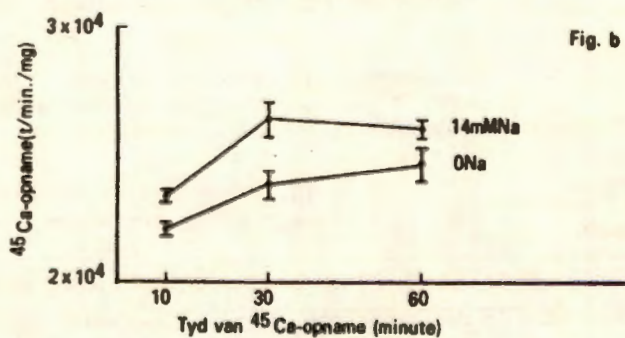
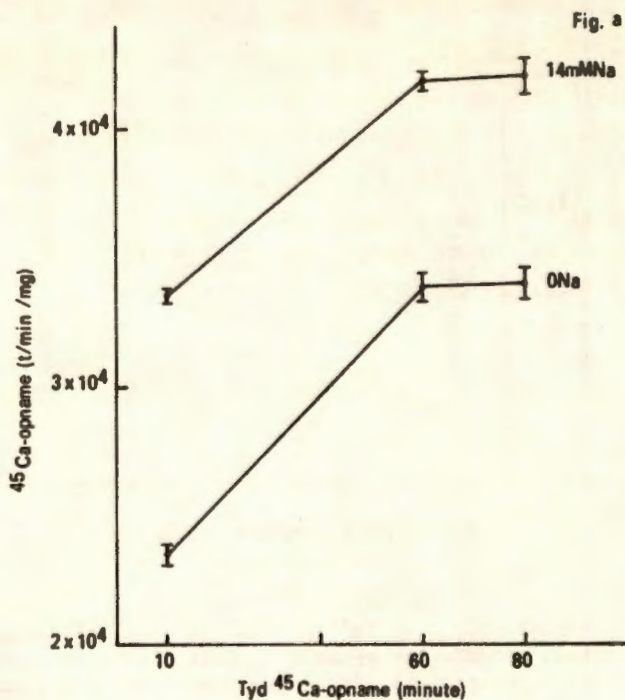
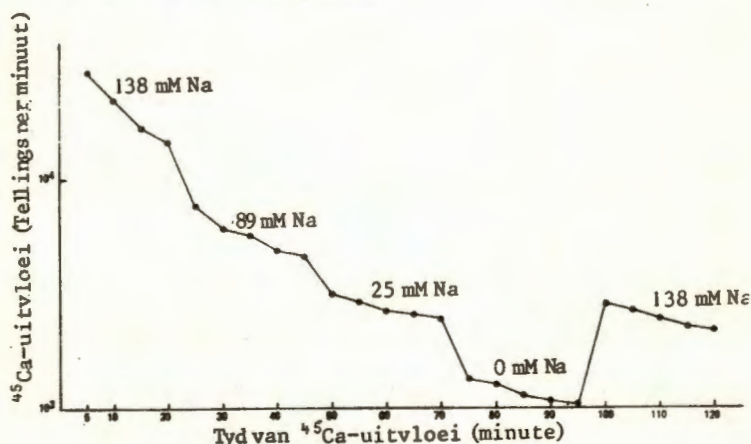


Figure 9a en 9b

^{45}Ca -opname by 14 mM Na^+ as 'n funksie van die tyd. In die eksperiment is daar na die tyd in LaCl_3 -Tirode gespoel. Voor die opnametyd is vir 1 uur in 0 Na^+ -Tirode geadapteer. Figuur a: ^{45}Ca -opname by 10, 60 en 80 minute. Elke punt is die rekenkundige gemiddelde van 3 waardes.

Figuur b: ^{45}Ca -opname by 10, 30 en 60 minute. Elke punt is die rekenkundige gemiddelde van 4 waardes.

Aangesien ^{45}Ca -opname dus nie die afname in kontraktiliteit kon verklaar nie, is met behulp van ^{45}Ca -uitvloei na 'n verklaring gesoek. 'n Afname in uitvloei is waargeneem met 'n verlaging in die Na^+ van die perfusiemedium vanaf 138 mM na 89 mM, vanaf 89 mM na 25 mM en vanaf 25 mM na 0 mM. Met 'n verhoging in Na^+ in die perfusiemedium van 0 na 138 mM is 'n toename in uitvloei waargeneem.



Figuur 10

^{45}Ca -uitvloei by verskillende Na^+ -konsentrasies
as 'n funksie van die tyd
(kyk ook Tabel 2 a)

Eksperiment	Persentasieverandering			
	138 mM - 89 mM	89 mM-25 mM	25 mM-0	0-138 mM
1	- 35	- 31	- 75	+ 30
2	- 24	- 41	0	+ 45
3		- 40	- 21	+ 33
4	- 20	- 61	- 8	+ 52
R	- 26,3%	- 43,25%	- 26%	+ 40%

Tabel 2a

Eksperiment	Persentasieverandering		
	0 - 25 mM	2,5 mM - 89 mM	89 mM - 138
1	+ 200	+ 114	+ 56
2	+ 238	+ 123	+ 136
3	+ 75	+ 38	+ 44
$\bar{R}$	+ 171%	+ 91,6%	+ 78,6%

Tabel 2b

Die persentasieverandering in die ^{45}Ca -uitvloeï met 'n verandering in die Na^+ -konsentrasie in die perfusiemedium.

- dui 'n %-afname aan
- + dui 'n %-toename aan

2(a) Die eksperiment is begin by 138 mM Na^+ , dit wil sê by die normale Na^+ -konsentrasie in die Tirode

2(b) Die eksperiment is begin by 0 mM Na^+

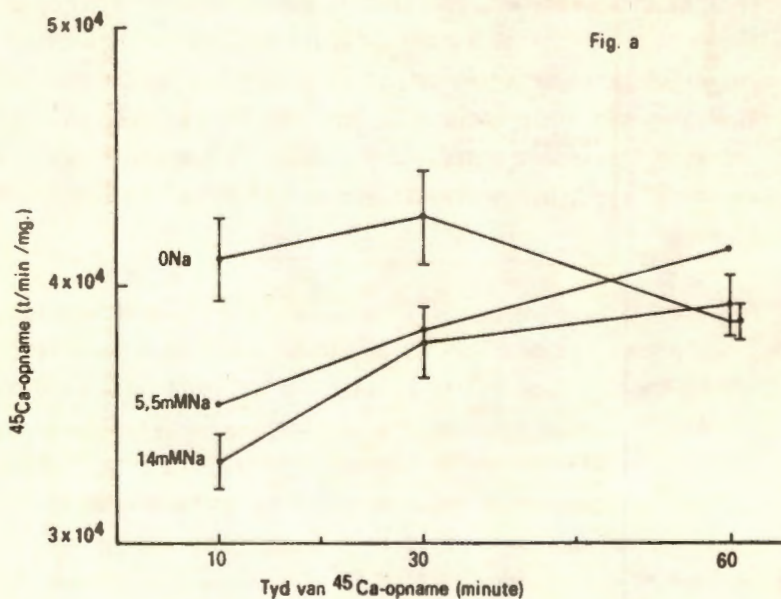
'n Uitvloeï-eksperiment is ook gedoen deur die uitvloeïbepalings by 0 Na^+ te begin. Vanaf 0 Na^+ word die natrium in die perfusie-medium verhoog na 25 mM, vanaf 25 mM na 89 mM en vanaf 89 mM na 138 mM. Daar is met elke verhoging in Na^+ 'n toename in uitvloeï gekry by al die spierpreparate (Tabel 2b). Dit ondersteun dus die resultate soos in figuur 10 en Tabel 2a voorgestel is. 'n Verhoging in Na^+ vanaf 0 na 25 mM het 'n toename in uitvloeï tot gevolg wat moontlik inhiberend op kontraktiliteit sal inwerk en dus 'n verslapping van die marmotspier tot gevolg sal hê.

Die uitvloeïresultate kan dus moontlik deels 'n verklaring verskaf vir die waarneming soos in figuur 6, waar geen protagonistiese verskynsel waargeneem word nie, terwyl die invloeï-

eksperimente weer dui op protagonisme.

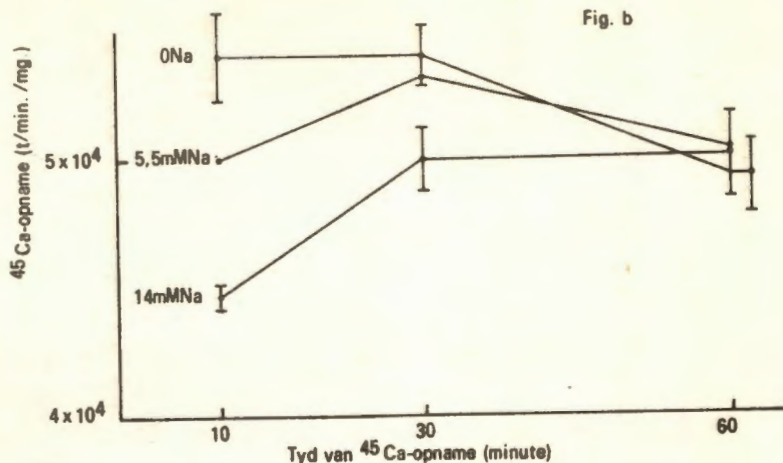
In 'n poging om meer inligting te bekom aangaande die teenstrydigheid tussen ons resultate en die van Busselen et al., (1973 en 1975), is verdere opnamestudies gedoen met die klem op die eksperimentele milieu en die tydsduur van die eksperimente. Die moontlike verandering in opname as gevolg van verandering of beskadiging van die preparaat, tydens die lang periode by 0 Na^+ , het as uitgangspunt gedien in die volgende opnamestudies. Daar is vooraf vir 1 uur gestabiliseer in 138 mM Na^+ -Tirode (normale Tirode).

Die stabilisasie vooraf in Tirode, het drastiese verandering in ^{45}Ca -opnames tot gevolg. Na 30 minute van ^{45}Ca -opname is die opname hoër by 0 mM Na^+ as by 14 mM Na^+ (figuur 11a en 11b). Hierdie resultate verklaar die verslapping wat waargeneem is by 14 mM Na^+ (figuur 6) en is teenoorgestel aan die bevindings by 0 mM Na^+ (figuur 9a en 9b). Na 1 uur van ^{45}Ca -opname is 'n afname in opname waargeneem by 0 Na^+ , sodanig dat dit 'n laer waarde vertoon as die opname by 14 mM Na^+ (figuur 11a en figuur 11b). (Daar het nou reeds 2 ure verloop nadat met adaptasie begin is). Na die kruising van die 0 Na^+ en 14 mM Na^+ lyne stem die resultate dus ooreen met Busselen et al., (1973 en 1975) se resultate wat 'n hoër invloed by 14 mM Na^+ as by 0 mM Na^+ vertoon, en ondersteun dus protagonisme. Die opnamewaardes by $5,5 \text{ mM Na}^+$, wat nie soos die waardes by 0 mM Na^+ onder die opnamewaardes by 14 mM Na^+ daal nie, dui waarskynlik op beskadiging of verandering van die spierpreparaat by 0 mM Na^+ , wat te wyte kan wees aan beskadiging van die sel as gevolg van Ca^{2+} -oorbelading (Fleckenstein et al., 1974). By 0 mM Na^+ is daar geen ekstrasellulêre Na^+ om met die Ca^{2+} te kompeteer nie.



FIGUUR 11 a

^{45}Ca -opname by 0, 5,5 en 14 mM Na^+ in die per-fusiemedium. Voor die opnametyd is daar vir 1 uur geadapteer in normale Tirode. Elke punt is die rekenkundige gemiddelde van 3 waardes. In die eksperiment is daar nie na die opname in LaCl_3 -Tirode gespoel nie.

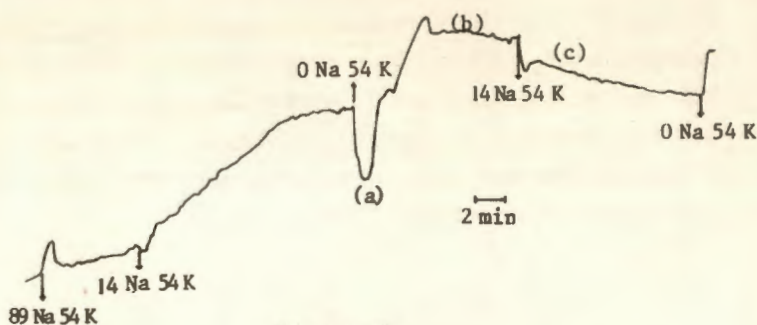


Figuur 11 b

^{45}Ca -opname by 0, 5,5 en 14 mM Na^+ in die perfusiemedium. Voor die opnametyd is daar vir 1 uur geadaptieer in normale Tirode. Elke punt is die rekenkundige gemiddelde van 4 waardes. Na die opnametyd is daar in LaCl_3 -Tirode gespoel.

Die vraag ontstaan nou of antagonisme soos waargeneem met kontraktuureksperimente deur Allers (1972) en antagonisme soos waargeneem deur Busselen et al., (1973 en 1975) dieselfde is en of spesieverskille 'n rol speel.

Figuur 12 illustreer 'n verslapping met 'n verlaging van die ekstrasellulêre Na^+ -konsentrasie na 0 (a op figuur 12).

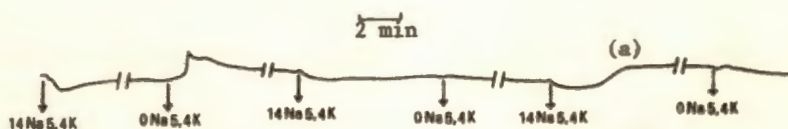


Figuur 12

Die invloed van veranderinge in die ekstrasellulêre Na^+ -konsentrasie op kontraktuur by 54 mM K^+

Die afname in meganiese spanning stem ooreen met protagonisme, maar slegs vir 'n kort tydsduur, aangesien die spanning, na ongeveer 1½ minute, na 'n hoër vlak styg as die spanning by 14 mM Na^+ -Tirode (b op figuur 12). Die eksperiment van figuur 12 is presies volgens die prosedure uitgevoer wat Allers (1972) gebruik het. Die verslapping wat volg by toediening van 14 Na by c, figuur 12, stem ooreen met die resultaat van figuur 6. Die al kleiner wordende verskil tussen meganiese spanning met veranderinge tussen 0 Na^+ en 14 mM Na^+ , het die spekulasie laat ontstaan dat omkering van die kontraktuur moontlik sal plaasvind na die verloop van ongeveer 120 minute, dit wil sê dat 'n volgehoue hoër meganiese spanning by 14 mM Na^+ as by 0 mM Na^+ verkry sal word, 'n resultaat soortgelyk aan die van Busselen et al., (1973 en 1975). Figuur 6 ondersteun ook die spekulasie. Hierdie omkering kon egter in 'n groot aantal eksperimente met marmothartspiertjies nie aangetoon word nie, ten spyte van die ^{45}Ca -vloeiresultate van figuur 11 wat 'n omkering aantoon. 'n Verklaring van hierdie anomalie kan moontlik daarin lê dat die Ca^{2+} -uitvloei (figuur 10) die Ca^{2+} -opname oorheers by die marmot.

In teenstelling met die marmotspierpreparate kon by 'n konyn=spierpreparaat aangetoon word dat die omkering wel plaasvind. Voor die verloop van 2 ure is 'n spontane toename in meganiese spanning verkry, a in figuur 13 en hierna is 'n afname in meganiese spanning verkry as die ekstrasellulêre Na^+ -konsentrasie van 14 na 0 mM verlaag word (Figuur 13).



Figuur 13

Die invloed van veranderinge in die ekstrasellulêre natriumkonsentrasie, by 5,4 mM kalium, op kontraktuur.
(a) — spontane toename in spanning

In die eksperiment is van konynpapiëlêrspier gebruik gemaak. Al die ander eksperimente is met marmot=spiertjies uitgevoer

Die veranderinge in meganiese spanning met veranderinge van 0 mM Na^+ na 14 mM Na^+ en van 14 mM Na^+ na 0 mM Na^+ stem dus ooreen met die resultate van Busselen et al., (1973 & 1975). Dat spesieverskille moontlik 'n rol kan speel, blyk uit figure 6 en 13. 'n Goeie kontrole-eksperiment sal 'n soortgelyke eksperiment wees as wat voorgestel is in figure 10 en 11, maar met konynhartspier in plaas van marmothartspier. Daar=deur sal moontlik meer sekerheid verkry word aangaande die belangrikheid van Ca^{2+} -uitvloei vir kontraktiliteitsveranderinge. Daar sal ook moontlik meer lig op spesieverskille en beskadiging gewerp word.

Indien die oorkruising van die 0 en 14 mM lyne in figuur 11 aanvaar word as 'n aanduiding van beskadiging kan die fisiologiese betekenis van volgehoue protagonisme bevraagteken word. Die kortstondige protagonisme, soos aangetoon in figuur 12, het waarskynlik meer fisiologiese betekenis omdat dit nie as voorwaarde van ontstaan 'n lang periode van blootstelling aan 0 mM Na^+ het nie. As in aanmerking geneem word dat Allers, (1972) volgehoue protagonisme verkry het sonder lang periodes vooraf in 0 mM Na^+ , bestaan die moontlikheid dat dié protagonisme nie dieselfde verskynsel is as die van Busselen et al., (1973 & 1975) nie en dus moontlik ook nie afhanklik is van dieselfde onderliggende meganismes nie.

Alhoewel dit nie in hierdie studie aangetoon kon word nie, bestaan die moontlikheid dat volgehoue protagonisme wel met marmotte verkry kan word. Dit sal goed aansluit by die oorkruising van die 0 mM Na^+ en 14 mM Na^+ lyne van figuur 11. In dié geval sal 'n toename in Ca^{2+} -invloei volgehoue protagonisme verklaar.

Vir die verklaring van kortstondige protagonisme by marmot-hartspier (figuur 12) met behulp van ^{45}Ca -vloei studies sal die vloei studies afgestem moet word op die kortstondige fase. Dit sal egter vanweë die kort duur daarvan kwalik met die huidige tegnieke gedoen kan word.

Hipotese 2 (naamlik dat die toename in meganiese spanningsontwikkeling, wat verkry word met 'n verhoging van 0 na 20 mM ekstrasellulêre Na^+ (protagonisme), toegeskryf kan word aan 'n toename in Ca^{2+} -opname) is dus nie 'n goeie hipotese nie. Dit kan wel goed wees vir die gevalle waar langdurige protagonisme verkry is, maar kan net sowel 'n swak hipotese

wees in die sin dat weefselbeskadiging dan moontlik ingetree het, na die lang vooraf blootstelling aan 0 mM Na^+ , sodat die fisiologiese nut van die gevolgtrekking nie betekenisvol is nie. Volgehoue protagonisme op sigself kan dus moontlik 'n aanduiding van weefselbeskadiging wees.

Die eksperimentele basis sou dus verder verfyn moet word om meer insig oor die verskynsel van antagonisme en protagonisme te verkry. In so 'n eksperimentele opset sal ^{45}Ca -uitvloei-studies 'n belangrike rol speel, aangesien dit skynbaar sensitief is vir veranderinge in die Na^+ -konsentrasie van die perfusiemedium (figuur 10).

Die eksperimentele resultate leen dit op die huidige stadium nie daartoe om 'n sinvolle hipotese te maak in die plek van hipotese II nie. Die resultate soos aangebied in figuur 11 dui daarop dat voorstelling van hierdie projek moontlik tot 'n sinvolle oplossing kan lei indien protagonisme tussen $5,5$ en 14 mM Na^+ ondersoek word, 'n gebied waar waarskynlik min of geen weefselbeskadiging plaasvind nie.

HOOFSTUK V

ALGEMENE BESPREKING

Die selektiewe deurlaatbaarheidseienskappe van die selmembraan is onontbeerlik vir die beheer van die selvolume en die intrasellulêre ioonsamestelling, die inbeweging van voedingstowwe, die eliminasië van afvalprodukte en in die geval van eksitêerbare selle, soos senuweeselle en spierselle, vir die geleiding van die aksiepotensiaal, oordrag van die aksiepotensiaal en kontraktiliteit. Dit is ook die eerste skans tussen die ekstrasellulêre en intrasellulêre omgewing wat deur 'n toekennende stof deurdring moet word, om die homeostase intrasellulêr te verstuur en 'n siektetoestand tot gevolg te hê.

Bogenoemde paragraaf beklemtoon die belangrikheid van die selmembraan, vir die sel en die organisme. Die baie leemtes en soms paradoksale bevindings, wat bestaan in die kennis aangaande die verbande tussen die selmembraan, intrasellulêre strukture en die kontraktiesproses, maak toekomstige navorsing van uiterste belang, nie net vir die fisiologie nie, maar ook vir die patologie.

In hierdie studie is verbande tussen die gebeure by die selmembraan, met behulp van kalsiumvloei studies, en die kontraktiliteit van die spier met behulp van kontraktuureksperimente, nagevors.

'n Teenstrydigheid is waargeneem wat betref die verskynsel van antagonisme. Dit blyk dat antagonisme, soos grafies voor-

gestel word in figuur 5. en beskryf word deur Busselen et al, (1973 en 1975) nie noodwendig voorkom by hartspierpreparate nie, soos in Hoofstuk IV aangetoon is. Daar moet ook beslis onderskei word tussen volgehoue en kortstondige protagonisme.

Die verskille betreffende protagonisme, tussen die resultate in dié projek en resultate in die literatuur kan moontlik toegeskryf word aan spesieverskille en beskadiging van die preparaat. Indien die verskil aan spesieverskille toegeskryf sou kon word, sal dit 'n verskil in beheer van die kontraktsieproses behels. Dit is dus essensieel om met die navor-sing verder te gaan, indien nuwe kennis of bevestiging van bestaande kennis verkry wil word aangaande die beheerprosesse van kontraktiliteit. 'n Bestudering van spesieverskille in bogenoemde verband sal dus noodwendig lei tot die beskikbaarstelling van basiese kennis.

Indien onomkeerbare beskadiging voorkom, speel die tydsaspekheel waarskynlik 'n belangrike rol in die funksionering van hartspier onder toestande van lae ekstrasellulêre Na^+ -konsentrasies. Beskadiging van hartpreparate is reeds aangetoon tydens kalsiumoorbelading (Fleckenstein et al., 1974). Omdat verlaging van Na^+ in die perfusiemedium lei tot 'n toename in Ca^{2+} -opname, kon Ca^{2+} -oorbelading moontlik ook beskadiging tot gevolg gehad het by die spierpreparate wat in die kontraktuur-eksperimente van hierdie studie gebruik is, en/of beskadiging tot gevolg gehad het by die preparate van die ander outeurs soos genoem onder Hoofstuk IV. Morad en Rolett (1972) noem kontraktuur dan ook 'n *state of calcium overload*.

Daar kan dus nie sonder meer gesê word dat volgehoue protagonisme plaasvind as gevolg van beskadiging nie, of dat dit nie

plaasvind as gevolg van beskadiging nie. Daar moet dus eers vasgestel word wat die normale proses is (binne die eksperimentele opset): 'n volgehoue afname in kontraktuurspanning met 'n verlaging in Na^+ in die perfusiemedium van 14 mM na 0 (pro=tagonisme) of 'n toename in kontraktuurspanning met 'n verlaging in Na^+ van 14 mM na 0, ná 'n aanvanklike kortstondige afname (figuur 12).

Selfs al het geen weefselbeskadiging plaasgevind nie, bly die feit dat by onfisiologiese toestande gewerk word, 'n faktor wat in ag geneem moet word. In teenstelling met 'n verhoging in die K^+ -konsentrasie tot by 40 mM (kyk hipotese 1), kan 'n ekstrasellulêre daling van Na^+ kleiner as 20 mM moeilik gerealiseer word. Die nut van so 'n eksperiment lê egter tog daarin dat aspekte van die basiese meganisme onder hierdie omstandighede bestudeer kan word, wat moontlik na normale fisiologiese toestande geëkstrapoleer kan word. So byvoorbeeld sal omkering van die ^{45}Ca -vloei grafieke (figuur 11) by lae ekstrasellulêre Na^+ -konsentrasies die bestaan van 'n Ca^{2+} -pomp kan aantoon wat afhanklik van veranderinge in die natriumkonsentrasiegradiënt is.

Indien spesieverskille die rede vir die teenstrydigheid is, kan die verskil in waarneming albei *normale* gebeurtenisse vir die verskillende spesies onder dieselfde eksperimentele toestande wees.

Sodra uitsluitel oor bogenoemde teenstrydigheid verkry is, sal lig gewerp word op die beheerprosesse van kontraktuur en kan die beheerprosesse moontlik meer sinvol verder ondersoek word.

Die antagonistiese en/of protagonistiese rol van Na^+ en Ca^{2+} by die selmembraan, sal dus moontlik grondiger bewys wees.

Die belangrikheid van kalsiumvloeistudies (opnames sowel as uitvloei), word beklemtoon deur die resultate verkry soos bespreek in 4.2. 'n Belangrike voorwaarde vir die verklaring van kontraktuurverskynsels met behulp van vloeistudies, is dat die eksperimentele toestande so goed as moontlik moet ooreenstem.

Die waarneming dat kontraktuur toeneem met 'n verhoging in die ekstrasellulêre K^+ tot by 'n sekere kontraktuurhoogte en daarna afneem met verdere verhoging in die K^+ -konsentrasie, is nie soortgelyk aan die antagonistiese en protagonistiese verskynsel wat onder 4.3 bespreek is nie. Die waarnemings met veranderinge in die ekstrasellulêre K^+ kan moontlik ook toegeskryf word aan veranderinge in Ca^{2+} -vloei deur die sarkolemma en veranderinge in Ca^{2+} -vrystelling en -opname deur die sarkoplasmiese retikulum. Ca^{2+} -vrystellings en -opnames deur die sarkoplasmiese retikulum kan egter ook afhanklik wees van Ca^{2+} -vloeiveranderinge. Die mate van Ca^{2+} -beskikbaarstelling aan die kontraktiele proteïne, is dus in 'n groot mate afhanklik van die ekstrasellulêre Na^+ - en K^+ -konsentrasies. Die rol van verandering in die membraanpotensiaal, wat 'n baie belangrike faktor is betreffende die beheer van kontraktiliteit, moet altyd in samehang met bogenoemde faktore gesien word.

Karakteristieke eienskappe van spierselle, hang nou saam met veranderinge in membraandeurlaatbaarheid, wat een van die belangrikste eienskappe van lewe en ook een van die ingewikkeldste en mees onverklaarbare verskynsels in die fisiologie is.

HOOFSTUK VI

OPSOMMING

In die studie is ^{45}Ca -vloeibepalings en kontrakture gedoen. Met behulp van die ^{45}Ca -vloeibepalings is eienskappe van kontrakture by lae ekstrasellulêre K^+ -konsentrasies en lae ekstrasellulêre Na^+ -konsentrasies bestudeer.

Eksperimentele resultate wat plaaslik verkry is, toon aan dat die kontraksiekrag eers toeneem (met progressiewe verhoging van die K^+ -konsentrasie in die perfusievloeistof) en dan afneem nadat dit 'n maksimum, by ongeveer 40 mM K bereik het. Dit is in teenstelling met resultate wat aantoon dat die kontraksiekrag konstant bly nadat dit 'n maksimum bereik het (fig. 1). Volgens hipotese I is die uitvloei van Ca^{2+} deur die sarkolemma verantwoordelik vir eienskappe van die verband tussen kontraksiekrag en die membraanpotensiaal (ekstrasellulêre K^+ -konsentrasie). Dit is in hierdie studie waargeneem dat die uitvloei van ^{45}Ca deur die sarkolemma moontlik verantwoordelik is vir die bogenoemde eienskappe. Die afname in kontraksiekrag nadat 'n maksimum bereik is, is dus afhanklik van ^{45}Ca -uitvloei. Met 'n verhoging van 5,4 mM K^+ na 25 mM K^+ is 'n toename in ^{45}Ca -opname verkry en ook met 'n verhoging van 25 mM na 80 mM K^+ . Die toename in ^{45}Ca -opname kan dus die aanvanklike verhoging in kontraktiliteit verklaar, maar nie die afname in kontraktiliteit by K^+ -konsentrasies hoër as 25 mM K^+ nie.

Hipotese II lui dat die toename in meganiese spanningsontwikkeling wat verkry word met 'n verhoging in die ekstrasellulêre

Na^+ -konsentrasie van 0 na 20 mM (volgehoute antagonisme) toegeskryf kan word aan 'n toename in ^{45}Ca -opname.

Die kontraktuurresultate in hierdie studie het aangetoon dat die volgehoute antagonistiese verskynsel nie altyd waargeneem word met 'n verandering van 0 na 14 mM Na^+ nie. Met behulp van ^{45}Ca -vloei-eksperimente en totale Ca-bepalings waar adaptasie van die spierpreparaat vir 1 uur by 0 mM Na^+ -Tirode plaasgevind het, is aangetoon dat die eksperimente moontlik volgehoute antagonisme kan verklaar. Die ooreenkomstige meganiese veranderinge het egter nie volgehoute antagonisme aangetoon nie. Met Ca-vloei eksperimente waar adaptasie by normale Tirode plaasgevind het is aangetoon dat volgehoute antagonisme teoreties eers kan ontstaan na 2 uur se perfusie by 0 Na. Dit blyk uit die eksperimente dat die ^{45}Ca -vloei-bepalings by 0 mM Na^+ , volgehoute antagonisme moontlik kan verklaar.

Kortstondige antagonisme is by marmothartpreparate met behulp van kontraktuureksperimente aangetoon (fig. 12). Om verdere kennis oor die verskynsel te bekom sal ^{45}Ca -vloei-bepalings oor 'n baie kort tyd gedoen moet kan word.

Die resultate wat verkry is dui moontlik beskadiging van die preparaas by 0 mM Na^+ -konsentrasies na 'n sekere tyd aan. Die resultate dui ook aan dat moontlike spesieverskille in aanmerking geneem moet word by die interpretasie van resultate.

SUMMARY

In this study ^{45}Ca -fluxes and contractures were done. Characteristics of contractures at low extracellular K^+ -concentrations and low extracellular Na^+ -concentrations were evaluated by means of ^{45}Ca -fluxes.

Experimental results, locally done, show an increase in the force of contraction and then a decline at about 40 mM K^+ . The K^+ -concentration in the perfusion medium was progressively increased. This is in contrast with results which show a constant value in the force of contraction when a certain K^+ -concentration was reached (fig. 1). According to the first hypothesis the efflux of ^{45}Ca is responsible for the characteristics of the relationship between the force of contraction and the membrane potential (extracellular K^+ -concentration).

It was observed in this study that ^{45}Ca -efflux can be responsible for this characteristics. The decline in the force of contraction after a maximum was reached is thus related to ^{45}Ca -efflux. An increase in ^{45}Ca -influx was observed with an increase from 5,4 mM K^+ to 25 mM K^+ as well as with an increase from 25 mM K^+ to 80 mM K^+ . The increase in ^{45}Ca -influx can explain the initial increase in contractility, but not the decline in contractility at higher K^+ -concentrations.

According to the second hypothesis the increase in mechanical force, with an increase in the extracellular Na^+ -concentration from 0 to 20 mM Na^+ (sustained protagonism) can be explained by an increase in ^{45}Ca -influx.

The contracture results in this study indicate that sustained antagonism can not always be observed when the Na^+ -concentration is altered from 0 to 14 mM Na^+ . With ^{45}Ca -fluxes and the determination of the total Ca-content (when the muscle was adapted for 1 hour at 0 mM Na^+) the experimental results offer a possible explanation for the sustained antagonism. The corresponding mechanical results however, did not show sustained antagonism. In experiments in which adaptation took place in normal Tyrode, it were shown that sustained antagonism depends on the medium in which the adaptation took place. It is suspected that sustained antagonism depends on 0 mM Na^+ in the perfusion medium

A antagonistic effect with a short duration could be observed in contracture experiments with guinea-pig heart muscle (fig. 12). To get more information about this effect ^{45}Ca -fluxes should be done in a very short time. In contracture experiments with rabbit heart muscle a reversal was observed after approximately 2 hours. In other words it took a certain time before the antagonistic effect could be observed.

The results indicate possible damage of the muscle at 0 mM Na^+ when a certain time has elapsed. These results also indicate possible specie differences which may play a role in the interpretation of the results.

LITERATUUR

ALLERS, N.J. (1972)

Die bestudering van die meganisme van hartspierkontraksie met behulp van kalium-kontraktuur. M.Sc-verhandeling (Fisiologie). P.U. vir C.H.O. Potchefstroom.

ANDERSON, K.E. & EDMAN, K.A.P. (1974)

Effects of lanthanum on potassium contractures of isolated twitch muscle fibres of the frog. Acta Physiol. Scand. 90: p. 124.

BAKER, P.F. (1972)

Transport and metabolism of calcium ions in nerve. Prog. Biophys. Molec. Biol. 24: p. 177.

BAKER, P.F., BLAUSTEIN, M.P., HODGKIN, A.L. & STEINHARDT, R.A. (1969)

Influence of calcium on sodium efflux in squid axons. J. Physiol. (Lond) 200 p. 431.

BAKER, P.F. & GLITSCH, H.G. (1973)

Does metabolic energy participate directly in the Na^+ -dependent extrusion of Ca^{+} -ions from squid giant axons? J. Physiol. 233: p. 44.

BEELER, G.W., Jr. & REUTER, H. (1970a)

Membrane calcium current in ventricular myocardial fibres. J. Physiol., 207 p. 191.

- BEELER, G.W., Jr. & REUTER, H. (1970b)
The relation between membrane potential, membrane currents, and activation of contraction in ventricular myocardial fibres. *J. Physiol.* 207 p. 211.
- BIANCHI, C.P. & SHANES, A.M. (1959)
Calcium influx in skeletal muscle at rest, during activity, and during potassium contraction. *J. Gen. Physiol.*, 42: p. 803.
- BRAUNWALD, E., ROSS, J. & SONNENBLICK, E.H. (1967, 1968)
Mechanisms of contraction of the normal and failing heart, 1e opgaaf, Little Brown and Company. Boston.
- BROBECK, J.R. (1973)
Best & Taylor's physiological basis of medical practice, 9de opgaaf, The Williams & Wilkins Company Baltimore.
- BUSSELEN, P. & CARMELIET, E. (1973)
Protagonistic effects of Na and Ca on tension development in cardiac muscle at low extracellular Na concentrations. *Nature New Biol.* 243: p. 57.
- BUSSELEN, P. & VAN KERKHOVE, E. (1975)
The effects of low external sodium on contracture tension and Ca movements in the goldfish ventricle. *Arch. Internat. Physiol. Biochem.* 83: p. 337.
- CARAFOLI, E. (1974)
Mitochondria in the contraction and relaxation of heart. Recent advances in studies on cardiac struc=

ture and metabolism. Vol. 4. *Myocardial Biology*.
Dhalla, N. S. University Park Press. Baltimore.

CARAFOLI, E., TIOZZO, R., LUGLI, G., CROVETTI, F. & KRATZING, C. (1974)

The release of calcium from heart mitochondria by sodium. *J. Molec. Cell. Cardiol.* 6: p. 361.

CHAPMAN, R.A. & MILLER, D.J. (1972)

Caffeine contractures induced in frog auricular trabeculae in the absence of external calcium. *J. Physiol.* 225: p. 52.

CONSTANTIN, L.L. & PODOLSKY, R.J. (1966)

Evidence for depolarization of the internal membrane system in activation of frog semitendinosus muscle. *Nature*, 210: p. 483.

CONSTANTIN, L.L. (1970)

The role of sodium current in the radial spread of contraction in frog muscle fibres. *J. Gen. Physiol.* 55: p. 703.

CRANFIELD, P.F. (1965)

The present status of paired pulse stimulation and postextrasystolic potentiation in the heart. *Bull. N.Y. Acad. Med.* 41: p. 736.

DAYSON, H. (1970)

A textbook of general physiology. Vol 2. 4de opgaaf. J & A Churchill. London.

EBASHI, S. & ENDO, M. (1968)

Calcium ion and muscle contraction. Progr. Biophys. Mol. Biol., 18: p. 123.

ENTMAN, M.L., BILLETTE, P.C., WALLICK, E.T., PRESSMAN, B.C. & SCHWARTZ, A. (1972)

A study of calcium binding and uptake by isolated cardiac sarcoplasmic reticulum: the use of a new ionophore (X 537 A). Biochem. Biophys. Res. Commun. 48: p. 847.

FANBURG, B., FINKEL, R.M. & MARTONOSI, A. (1964)

The role of calcium in the mechanism of relaxation of cardiac muscle. J. Biol. Chem. 239: p. 2298.

FLECKENSTEIN, A., JANKE, J., DÖRING, H.J. & LEDER, O. (1974)

Myocardial fiber necrosis due to intracellular Ca overload - a new principle in cardiac pathophysiology. (In: Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism. Vol. 4. *Myocardial biology*. Dhalla, N.S. University Park Press. Baltimore).p.563.

FOULKES, J.G., MILLER, J.A.D. & PERRY, F.A. (1973)

Repolarization - induced reactivation of contracture tension in frog skeletal muscle. Canad. J. Physiol. Pharmacol. 51. p. 324.

FOZZARD, H.A. (1977)

Heart: Excitation-contraction coupling. Ann. Rev. Physiol. 39: p. 201.

- GIBBONS, W.R. & FOZZARD, H.A. (1971)
High potassium and low sodium contractures in sheep cardiac muscle. *J. Gen. Physiol.* 58: p. 483.
- GLITSCH, H.G., REUTER, H. & SCHOLZ, H. (1970)
The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea-pig auricles. *J. Physiol.* 209: p. 25.
- GORDON, A.M., HUXLEY, A.F. & JULIAN, F.G. (1966)
Variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibers. *J. Physiol.* 184: p. 170.
- GROSSMAN, A. & FURCHGOTT, R.F. (1964b)
The effects of frequency of stimulation and calcium concentration on ^{45}Ca exchange and contractility on the isolated guinea-pig auricle. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 143: p. 120.
- HODGKIN, A.L. & HUXLEY, A.F. (1952)
A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. London.* 117: p. 500.
- HODGKIN, A.L. & HOROWICZ, P. (1960)
Potassium contractures in single muscle fibres. *J. Physiol.* 153: p. 386.
- HUXLEY, H.E. (1965)
Mechanism of muscular contraction. *Scientific American* 213: p. 18.

INESI, G. (1977)

Referaat gelewer op die kongres van die Fisiologie=
se Vereniging van Suider-Afrika. Potchefstroom.

JÖBSIS, F.F. & O'CONNOR, M.J. (1966)

Calcium release and reabsorption in the sartorius
muscle of the toad. Biochem. Biophys. Res. Comm.,
25: p. 246.

JOHNSON, E.A. & LIEBERMAN, M. (1971)

Heart: Excitation and contraction Ann. Rev. Physiol.
33: p. 1068.

JUNDT, H., PORZIG, H., REUTER, H. STUCKI, J.W. (1975)

The effect of substances releasing intracellular
calcium ions of sodium dependent calcium efflux
from guinea-pig auricles. J. Physiol. 244: p. 229.

KATZ, A.M. (1970)

Contractile proteins of the heart. Physiol. Rev.
50: p. 63.

KAVALER, F., FISCHER, V.J. & STUCKEY, J.H. (1965)

The potentiated contraction and ventricular contrac=
tility. Bull. N.Y. Acad. Med. 41: p. 592.

KLAUS, W. & LEE, K.S. (1969)

Influence of cardiac glycosides on calcium binding
in muscle subcellular components. J. Pharmacol.,
166: p. 68.

LANGER, G.A. (1964)

Kinetic studies of calcium distribution in ventricular muscle of the dog. *Circ. Res.* 15: p. 393.

LEE, K.S., HONG, S. A. & KING, D.H. (1970)

Effect of cardiac glycosides on interaction of Ca with mitochondria. *J. Pharmacol.*, 172: p. 180.

LEYTON, R.A. & SONNENBLICK, E.H. (1969)

The ultrastructure of the failing heart. *Amer. J. Med. Sci.* 258: p. 304.

LINDNER, E. (1957)

Die submikroskopische Morphologie des Herzmuskels. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 45: p. 702.

LÜTTGAU, H.C. & NIEDERGERKE, R. (1958)

The antagonism between Ca and Na ions on the frog's heart. *J. Physiol.* 143: p. 486.

MILLER, D.J. & MOISESCU, D.G. (1976)

The effects of very low external calcium and sodium concentrations on cardiac contractile strength and calcium-sodium antagonism. *J. Physiol.* 259: p. 283.

MORAD, M. & ROLETT, E.L. (1972)

Relaxing effects of catecholamines on mammalian heart. *J. Physiol.* 224. p. 537.

NAKAMARU, Y. & SCHWARTZ, A. (1972)

The influence of hydrogen ion concentration on calcium binding and release by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.*, 59: p. 22.

NAYLER, W.G. (1960)

A study of the *staircase* in ventricular muscle and its relationship to the inotropic activity of certain drugs. *J. Gen. Physiol.*, 44: p. 393.

NAYLER, W.G. & MERRILLEES, N.C.R. (1971)

Cellular exchange of calcium. (In: Calcium and the heart. Harris, P. & Opie, L. 1ste Opgaaf. Academic Press. London & New York). p. 24.

NIEDERGERKE, R. (1956b)

The potassium chloride contracture of the heart and its modification by calcium. *J. Physiol.*, 134: p. 584.

NIEDERGERKE, R. (1957)

The rate of calcium ions on the contraction of the heart. *J. Physiol.*, 138: p. 506.

NIEDERGERKE, R. (1963a)

Movement of Ca in frog heart ventricles at rest and during contractures. *J. Physiol.*, 167: p. 515.

NIEDERGERKE, R. (1963b)

Movement of Ca in beating ventricles of the frog heart. *J. Physiol.*, 167: p. 551.

OLSON, R.E. (1971)

Introduction. (In: Calcium and the heart. Harris, P. & Opie, L. 1st opgaaf. Academic Press. London & New York) p. 1.

PATRIARCA, P. & CARAFOLI, E. (1968)

A study of the intracellular transport of calcium in rat heart. J. Physiol. 72: p. 29.

PODOLSKY, R.J. (1964)

Maximum sarcomere length for contraction of isolated myofibrils. J. Physiol., 170: p. 110.

REUTER, H. & SEITZ, N. (1968)

The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. J. Physiol., 195: p. 451.

REUTER, H. (1973)

Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. Prog. Biophys. Mol. Biol. 26: p. 1.

REUTER, H. (1974)

Exchange of calcium ions in the mammalian myocardium. Mechanisms and physiological significance. Circ. Res. 34: p. 599.

REUTER, H. & SCHOLZ, H. (1968)

Über den einfluss der extracellulären Ca-konzentration auf Membranpotential und kontraktion isolierter Herzpräparate bei graduierter Depolarisation. Pflügers Arch. Ges. Physiol., 300: p. 87.

ROSEN, H. & FARAH, A. (1955)

Post-stimulation of contractility in the isolated auricle of the rabbit. *Amer. J. Physiol.*, 180: p. 75.

SCHOLZ, H. (1969)

Über die wirkung von calcium und natrium auf die kalium-kontraktur isolierten meerschweinchenvorhöfe Pflügers *Arch.* 308: p. 315.

SIMPSON, F.O. & OERTELIS, S.J. (1961)

Relationship of the sarcoplasmic reticulum to sarcolemma in sheep cardiac muscle. *Nature (London)* 189: p. 758.

SHINE, K.I. & LANGER, G.A. (1971)

Caffeine effects upon contraction and calcium exchange in rabbit myocardium. *J. Molec. Cell. Cardiol.* 3: p. 255.

SONNENBLICK, E.H. (1967)

Active state in heart muscle: its delayed onset and modification by inotropic agents. *J. Gen. Physiol.* 50: p. 661.

VAN WYK, M. (1973)

Die standaardisering van en die invloed van pH op K-kontraktuurresultate vir die gousiekteprojek. B.Sc (Honns.) - referaat. Instituut vir fisiologie= se navorsing. P.U. vir C.H.O., Potchefstroom.

VAN DER WALT, J.J. & ALLERS, N.J. (1973)

Regulation of heart muscle contraction by the sarcolemma. S.A. Mediese Tydskrif. 9 Junie. 1973: p. 967.

WEBER, A., HERZ, R. & REISS, I. (1963)

On the mechanism of the relaxing effect of fragmented sarcoplasmic reticulum. J. Gen. Physiol., 46: p. 599.

WEBER, A., HERZ, R. & REISS, I. (1964)

The regulation of myofibrillar activity by calcium. Proc. Roy. Soc., B; 160: p. 489.

WEBER, A., HERZ, R. & REISS, I. (1966)

Nature of the cardiac relaxing factor. Biochim. Biophys. Acta. 131: p. 188.

WENDT, I.R. & LANGER, G.A. (1977)

The sodium-calcium relationship in mammalian myocardium: effect of sodium deficient perfusion on calcium fluxes. J. Molec. Cell. Cardiol. 9: p. 551.

WILLIAMS, G.J., COLLINS, S., MUIR, J.R. & STEPHENS, M.R. (1975)

Observations on the interaction of calcium and hydrogen ions on ATP hydrolysis by the contractile elements of cardiac muscle. (In: Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism. Vol. 5. *Basic functions of cations in myocardial activity*. Fleckenstein, A. Dhalla, N.S. Urban & Schwarzenberg. München-Berlin-Wien) p. 273.

WINEGRAD, S. & SHANES, A.M. (1962)

Calcium flux and contractility in guinea-pig atria.
J. Gen. Physiol. 45: p. 371.

WINEGRAD, S. (1970)

The intracellular site of calcium activation of
contraction in frog skeletal muscle. J. Gen. Physiol.
55: p. 77.

WOOD, E.H., HEPPNER, R.L. & WIEDMANN, S. (1969)

Inotropic effects of electric currents. I. Positive
and negative effects of constant electric currents
of current impulse applied during cardiac action
potentials. II. Hypothesis: Calcium movements,
excitation-contraction coupling and inotropic effects.
Circ. Res., 24: p. 209.

BEDANKINGS

Graag bedank ek die volgende persone en departemente:

Prof. J.J. van der Walt wat as bekwame leier van die studie opgetree het.

Prof. P.J. Pretorius, vir sy aanbevelings en aanmoediging.

Mev. E. Schutte vir die keurige tikwerk.

Mej. M. du Plessis vir die noukeurige natrek van die figure.

Mnr. J. Swanepoel vir die taalkundige versorging.

Mnr. N. van Aardt vir die aanleer van die tegnieke in verband met die kontraktuureksperimente.

Mnr. P. Schutte vir sy hulp met die tegniese versorging.

Mev. E. Vorster vir haar hulp met die proeflees.

my vrou, Annette, vir al haar hulp en aanmoediging.

my ouers vir hulle aanmoediging.

my dogter, Karina, vir haar motivering.

my vriende vir hulle aanmoediging.

die departement Dierkunde vir die gebruik van die sintil-lasieteller.

die departement Chemie vir die gebruik van die atoomabsorpsiespektrofotometer.

die personeel van die Ferdinand Postma biblioteek vir die bind en die druk van die verhandeling.